

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER
6-(2- AMINOADIPINSÄURE) -AMP - LIGASE
AUS PENICILLIUM CHRYSOGENUM

Heinz Jürgen Bergmeyer
München 1979

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER 6-(2-AMINOADIPIN-
SÄURE)-AMP-LIGASE AUS *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Heinz Jürgen Bergmeyer
München 1979



1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Professor Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 5.3.79

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1974 bis Dezember 1978 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried ausgeführt.

Herrn Professor Dr. F. Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir jederzeit zuteil werden ließ.

Herrn Harald Wobser und Fräulein Jutta Straub danke ich sehr herzlich für die ausgezeichnete, zuverlässige und intelligente Mitarbeit seit Juli 1976 bzw. September 1978.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Professor Lynen danke ich für die hilfreiche Zusammenarbeit und für anregende Diskussionen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0008

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Aufzucht von <i>P. chrysogenum</i> und Isolierung der AAA-AMP-Ligase	10
2.1. Aufzucht von <i>P. chrysogenum</i>	10
2.2. Bestimmung der Aktivität von AAA-AMP-Ligase im ATP/ 32 PP _i -Austauschtest	11
2.3. Stabilität des Enzyms im zellfreien Extrakt	12
2.4. Isolierung der AAA-AMP-Ligase	15
2.4.1. Zellfreier Extrakt	15
2.4.2. AS-Fraktionierung	15
2.4.3. 1. Chromatographie an DEAE	15
2.4.4. Chromatographie an Hydroxylapatit	17
2.4.5. Filtration über Sepharose-CL-6B	18
2.4.6. 2. Chromatographie an DEAE	19
3. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Enzyms	21
3.1. Bestimmung des Molekulargewichtes an G-200	21
3.2. Analytische Ultrazentrifugation	22
3.3. Zentrifugation im Rohrzucker-Dichtegradienten	24
3.4. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen	25
3.5. Isoelektrische Fokussierung	26
3.6. Stabilität des gereinigten Enzyms	28
3.6.1. Thermostabilität	28
3.6.2. Abhängigkeit der Stabilität vom pH-Wert	29
3.6.3. Beeinflussung der Stabilität durch Salze und verschiedene Puffergemische	30

3.7.	Reinheitskriterien	30
4.	Katalytische Eigenschaften der AA-AMP-Ligase	32
4.1.	ATP/PP _i -Austausch	32
4.1.1.	Abhängigkeit der ³² P-ATP-Bildungsrate von der eingesetzten Enzymmenge und von der Dauer der Inkubation	33
4.1.2.	Einfluß von pH-Wert, Puffer-Konzentrationen und Salz-Konzentrationen auf den ATP/PP _i -Austausch	33
4.1.3.	Abhängigkeit des ATP/PP _i -Austausches von den Substratkonzentrationen	35
4.1.4.	Spezifität des Enzyms für Aminosäuren und Nucleosid-5'-Triphosphate	38
4.1.5.	Hemmung des ATP-PP _i -Austausches	38
4.2.	¹⁴ C-Aminoadipinsäure-6-Hydroxamat-Bildung; Aminodipinsäure-abhängige ATP-Spaltung	41
4.2.1.	Enzymatische Synthese von ¹⁴ C-AAA-NHOH	43
4.2.2.	γ- ³² P-ATP-Spaltung	47
4.2.2.1.	Abhängigkeit der γ- ³² P-ATP-Spaltung von der eingesetzten Enzymmenge und von der Dauer der Inkubation	48
4.2.2.2.	Abhängigkeit der ATP-Spaltung von den Substratkonzentrationen	50
4.2.2.3.	Nachweis von ³² PP _i im ATP-Spaltungstest	52
4.3.	ATP/ ¹⁴ C-ADP-Austausch	53
5.	Untersuchungen zur biologischen Funktion des Enzyms	56
5.1.	Tripeptid-Synthese	56
5.2.	Dipeptid-Synthese	58
5.3.	AAA-CHO-Bildung	60

5.4.	Versuche zur Isolierung eines Enzym-AMP- AAA-Komplexes	63
6.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	65
7.	Experimenteller Teil	67
7.1.	Verwendete Geräte	67
7.2.	Materialien	69
7.3.	Allgemeine Methoden	70
7.4.	Zu Kapitel 2.	77
7.5.	Zu Kapitel 3.	80
7.6.	Zu Kapitel 4.	82
7.7.	Zu Kapitel 5.	90
	LITERATURVERZEICHNIS	106

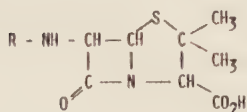
Verwendete Abkürzungen

AA	Aminosäure
AAA	DL-2-Aminoadipinsäure
AAA-AMP-Ligase	6-(DL-2-Aminoadipinsäure)-AMP-Ligase
AC	6-(DL-2-Aminoadipyl)-L-Cystein
ACV	6-(DL-2-Aminoadipyl)-L-Cysteiny-L-D-Valin
ACV-SO ₃ H	Sulfonsäure-Derivat von ACV
AK	Acetat-Kinase
AS	Ammoniumsulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
Bzl	Benzyl-
Ci	Curie
CoASH	Coenzym A
cpm	Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
CysSO ₃ H	Cystein-Sulfonsäure
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCC	Dicyclohexyl-Carbodiimid
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DMFA	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreit
EDTA	Äthylendiamin-Tetraessigsäure
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde (n)
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
I.E.	Internationale Einheit (1 I.E. = 5,99 µg Penicillin G-Na)
JAA	Jodacetamid
K _M	Michaelis-Konstante
ltr	Liter
MB	4-Methoxybenzylester
MG	Molekulargewicht
min	Minute (n)
MOZ	4-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-
NADP(H)	Nikotinamidadenindinucleotid-phosphat (reduziert)
NTP	Nucleosid-5'-Triphosphat

OD	optische Dichte
P.	Penicillium
PAS	Perameisensäure
PC	Papierchromatographie
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
PPO	2.5.-Diphenyloxazol
DM-POPOP	Dimethyl-1.4-Bis-2-(5-Phenyloxazol)benzol
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
SA	Serumalbumin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triäthanolamin
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	internationale Einheit für Enzyme (Umsatz von 1 μ Mol Substr./min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
Z	Benzyloxycarbonyl-

1. EINLEITUNG

Penicillin gehört zur Gruppe der Peptid-Antibiotika. Seine bakterizide Wirkung wurde erstmals von Fleming (1) im Jahre 1928 beobachtet. Demain (2) und anderen gelang 1959 und in den folgenden Jahren die Aufklärung der Struktur. Der Grundkörper aller Penicilline ist die 6-Aminopenicillansäure (6-APA), ein Dipeptid aus Cystein und Valin (Abb. 1).



R = H : 6-APA

R = C₆H₅ - CH₂ - CO - : PENICILLIN G

R = HO₂C - CH(NH₂) - (CH₂)₃ - CO - : ISOPENICILLIN N

Abb. 1: Grundstruktur der Penicilline

Die verschiedenen Penicilline unterscheiden sich nur im Rest R, der immer säureamidartig mit dem Kern verknüpft ist. Die Natur des Restes R bewirkt unterschiedliche Säurestabilität und Wasser- bzw. Lipid-Löslichkeit des Antibiotikums. Auch die Hydrolyse-Geschwindigkeit des β -Lactamringes durch β -Lactamasen (Penicillinasen) wird vom Rest R deutlich beeinflusst. Dies hat pharmakologische Bedeutung, denn die Reaktivität des β -Lactamringes ist entscheidend für die bakterizide Wirkung (3).

Die Biosynthese von Penicillin im Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* ist mit der Biosynthese des Lysins eng verknüpft.

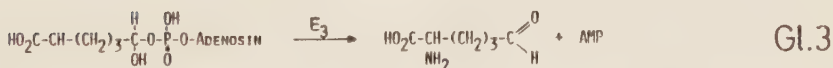
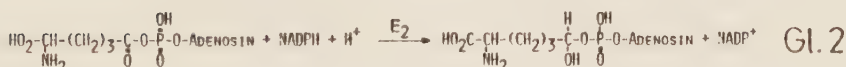
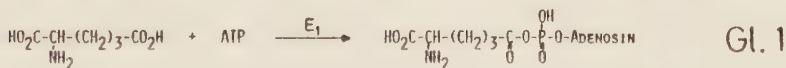
In beiden Stoffwechselwegen tritt Amino adipinsäure als Zwischenprodukt der Synthese auf. Amino adipinsäure wird in Bakterien über den Diaminopimelinsäureweg synthetisiert, während sie in Pilzen aus Acetyl-CoA und α -Ketoglutarat über den Homocitratweg gebildet wird (Abb. 2). Bei der Penicillin-Biosynthese wird Amino adipinsäure mit Cystein und Valin zum Tripeptid Amino adipylcysteinylvalin verknüpft. Zwei Ringschlüsse führen zum Isopenicillin N. Penicillin-Acyl-Transferasen katalysieren als letzten Schritt der Biosynthese den Austausch der Amino adipylseitenkette gegen andere Säurereste wie zum Beispiel Phenylelessigsäure oder Phenoxyessigsäure. Reduktion der Amino adipinsäure an der 6-Carboxylgruppe führt zu Amino adipinsäure-semialdehyd, der mit Glutaminsäure unter Reduktion zu Saccharopin verknüpft wird. Abspaltung von α -Ketoglutarat führt schließlich zum Lysin. Die Regulation der Lysin-Biosynthese durch Lysin als Feedback-Inhibitor konnte in verschiedenen Mikroorganismen wie *Saccharomyces* (4), *Rhodotorula* (5) und *Neurospora* (6) nachgewiesen werden. Hogg (7), Broquist und Sinha (8) konnten zeigen, daß sowohl die Biosynthese der Homocitrat-Synthase als auch die der 2-Amino adipyl-6-Semialdehyd-Glutamat-Reduktase durch Lysin gehemmt wird. Darüber hinaus wird Homocitrat-Synthase selbst durch Lysin inhibiert. Diese Ergebnisse geben eine gute Erklärung für den Befund Demains (9), daß Lysin ein starker Inhibitor der Penicillin-Biosynthese in *P. chrysogenum* ist. Durch Hemmung der Homocitrat-Synthase kann keine Amino adipinsäure mehr nachgeliefert werden, die Penicillin-Biosynthese kommt zum Erliegen. Durch exogene Zugabe von Amino adipinsäure wird die Penicillin-

Synthese wieder in Gang gebracht (10). Abraham und Mitarbeiter (11) beobachteten die Bildung des radioaktiv markierten Tripeptids Amino adipylcysteinylvalin (ACV) nach Inkubation von *P. chrysogenum* Kulturen mit L-¹⁴C-Valin; Bauer (12) wies die Synthese des Tripeptids aus den konstituierenden L-Aminosäuren in zellfreien Extrakten von *P. chrysogenum* nach. Loder und Abraham (13) konnten die Bildung von ACV in Extrakten von Ultraschall behandeltem Mycel aus dem Dipeptid L-2-Amino adipyl-L-Cystein (AC) und L-¹⁴C-Valin zeigen. Sie fanden diese "Tripeptid-Synthetase" fast ausschließlich in der Partikelfraktion des Extraktes. Die Konfiguration der Aminosäuren im Tripeptid wurde erst 1976 von Chan et al. (14) aufgeklärt. Kulturen von *P. chrysogenum* verwenden zwar ausschließlich die L-Formen von 2-Amino adipinsäure, Cystein und Valin; im gebildeten Tripeptid liegt jedoch Valin in der D-Form vor, An der Biosynthese von ACV muß also eine Racemase beteiligt sein.

Sowohl für die Synthese von L-2-Amino adipinsäure-6-semialdehyd, als auch für die Bildung von Amino adipylcysteinylvalin ist die Aktivierung der Amino adipinsäure an der 6-Carboxylgruppe Voraussetzung. Sagisaka und Shimura (15) beschrieben schon 1962 ein "Amino adipinsäure-Reduktase" - System aus Hefe, welches die Amino adipinsäure an der 6-Carboxylgruppe als Adenylat aktiviert. Sinha und Bhattacharjee (16) konnten dann 1971 durch Experimente mit Extrakten aus Hefemutanten die Existenz

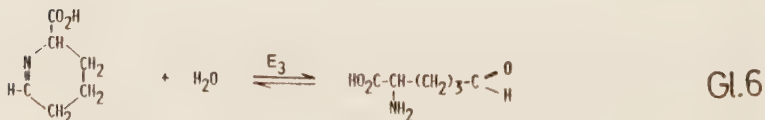
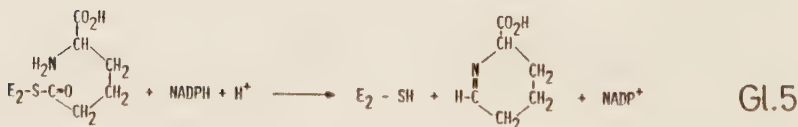
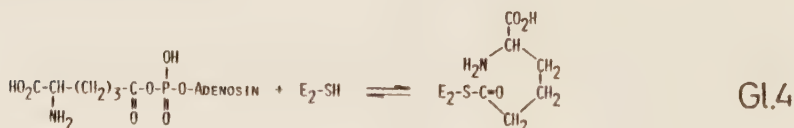
von drei verschiedenen Enzymen nachweisen, welche für die Reduktion von Amino adipinsäure zum Amino adipinsäure-6-semialdehyd erforderlich sind.

Protein 1 katalysiert die Aktivierung von Amino adipinsäure an der 6-Carboxylgruppe nach Gl. 1. Das gebildete Amino adipyladenylat wird von Protein 2 reduziert (Gl. 2). Die Autoren postulieren die Bildung des reduzierten Amino adipyladenylates. Protein 3 katalysiert nach dieser Hypothese die Spaltung von AAA-CHO-AMP in Amino adipinsäure-semialdehyd und AMP (Gl. 3).

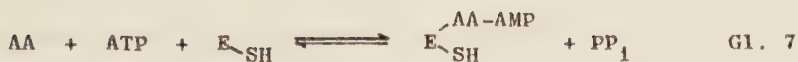


Die Bildung des reduzierten Adenylates als freies Zwischenprodukt erscheint uns allerdings fraglich. Nachdem Sagisaka und Shimura (15) nachgewiesen haben, daß die Aktivierung von Amino adipinsäure als Adenylat durch SH-Gifte nicht hemmbar ist, die Reduktion des Adenylates dagegen durch Jodacetamid vollständig blockiert wird, sollte an der Reduktion von Amino adipinsäure eine SH-Gruppe beteiligt sein. Denkbar wäre folgender Mechanismus:

Aminoadipinsäureadenylat (gebildet unter Katalyse von Protein 1 gemäß Gl. 1) reagiert nach Gl. 4 mit Protein 2. Die als Thioester gebundene Aminoadipinsäure wird reduziert und cyclisiert zu Δ -1-Piperidin-6-Carboxylsäure (Gl. 5). Protein 3 katalysiert sodann die rasche Gleichgewichtseinstellung zwischen freiem Aminoadipinsäuresemialdehyd und dessen cyclisierter Form (Gl. 6).



Die Aktivierung der AAA als Adenylat in diesem Enzymsystem ähnelt der Aktivierung von Aminosäuren für die Protein-Biosynthese und für die Biosynthese einer ganzen Reihe von Peptid-Antibiotika (17). So konnten Lipmann et al. (18) zeigen, daß bei der Biosynthese von Gramicidin S die einzelnen Aminosäuren als Adenylate aktiviert (Gl. 7) und als Thioester an das Enzym gebunden werden (Gl. 8).



An dieser 'Schwefelmatrixe' läuft dann die Polymerisation der Aminosäuren und die Cyclisierung des gebildeten Peptids ab (Abb. 3).

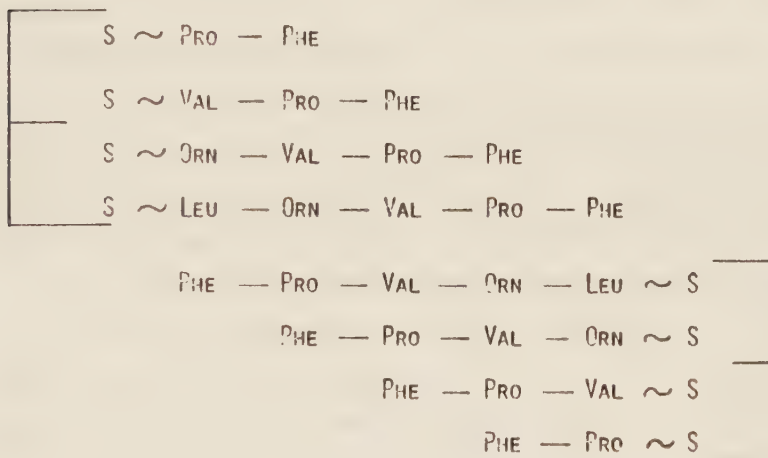


Abb. 3: Biosynthese von Gramicidin S in *B. brevis*;
Polymerisation der Aminosäuren zum cyclischen Peptid

Die Aktivierung der Aminosäuren für die Biosynthese von Amino-
adipylcysteinylvalin ist bis heute in der Literatur nicht be-
schrieben. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, daß die Bio-
synthese des Tripeptids analog der Gramicidin S Synthese an
einem Multienzymkomplex verläuft. In diesem Fall müßte
ein Protein zu isolieren sein, welches Amino-
adipinsäure, Cystein und Valin gemäß Gl. 7 und 8 als Adenylate aktiviert,

auf integrale SH-Gruppen überträgt und zum Tripeptid verknüpft. Es sei hier vorweggenommen, daß während der Isolierung von AAA-AMP-Ligase Amino adipinsäure, Cystein und Valin-aktivierenden Protein bis einschließlich der Chromatographie an DEAE-Sephadex gemeinsam angereichert wurde (s.S. 16). Diese Enzympräparation war jedoch nicht in der Lage, die Synthese von Tripeptid aus den drei Aminosäuren zu katalysieren (s.S. 56). Auch wurde im folgenden Anreicherungs-schritt (Chromatographie an Hydroxylapaptit, s.S. 17) Amino adipinsäure-aktivierendes Protein von Cystein- und Valin-aktivierendem Protein abgetrennt. Für die Biosynthese von Amino adipylcysteinylvalin ist daher ein Mechanismus denkbar, an dem mehrere einzelne Enzyme beteiligt sind. Dies konnte für die Biosynthese von Glutathion gezeigt werden (19); L-Glutaminsäure wird an der 6-Carboxylgruppe als Phosphat aktiviert und reagiert mit Cystein zum Dipeptid Glu-Cys. Nach Phosphorylierung der Carboxylgruppe des Cysteins wird das Dipeptid unter Katalyse der GSH-Synthetase mit Glycin zu Glutathion verknüpft.

Ein solcher Mechanismus würde unterstützt durch die Arbeiten von Loder und Abraham (s.o.), die zunächst die Bildung von AC postulieren. Das Dipeptid müßte dann an der Carboxylgruppe des Cysteins aktiviert werden, um schließlich mit Valin zum Tripeptid reagieren zu können (Gl. 9-11).



Uns interessierte in diesem Zusammenhang der Mechanismus der Aktivierung der konstituierenden Aminosäuren für die Biosynthese von Aminoacylcysteinylvalin, sowie der Mechanismus ihrer Verknüpfung zum Tripeptid.

Die vorliegende Arbeit beschreibt daher die Isolierung und Charakterisierung eines Aminoacylsäure-aktivierenden Enzyms, welches gemäß Gl. 9 die Bildung von 6-(2-Aminoacyl)-adenylat aus DL-2-Aminoacylsäure und ATP katalysiert.

Weiterhin werden Versuche gezeigt, die Aufschluß darüber geben sollten, in wie weit das isolierte Enzym an den oben beschriebenen Biosynthesewegen für Penicillin bzw. Lysin beteiligt ist.

2. AUFZUCHT VON *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* UND ISOLIERUNG DER AAA-AMP-LIGASE

2.1. Aufzucht von *Penicillium chrysogenum*

Die Aufzucht von *Penicillium chrysogenum* wurde in Submerskulturen durchgeführt. Mit einer Sporensuspension angeimpfte Vorkulturen in 2 ltr. Fernbachkolben dienten als Inokulum für die Zwischenkultur. Diese wuchs in 10 ltr. Fermentoren während 48 h zu einer dichten Zellmasse heran, mit der ein 200 ltr. Fermentor angeimpft wurde. Die Hauptkultur wurde nach 76 Stunden über eine Filterpresse geerntet und eingefroren. Teile des gefrorenen Mycels wurden nach Bedarf lyophilisiert und bei -20°C aufgehoben. Auf diese Weise erhielten wir 45 kg feuchtes Mycel, was ca. 7.5 kg lyophilisiertem Produkt entspricht. Abb. 4 zeigt das Wachstum der Kultur und

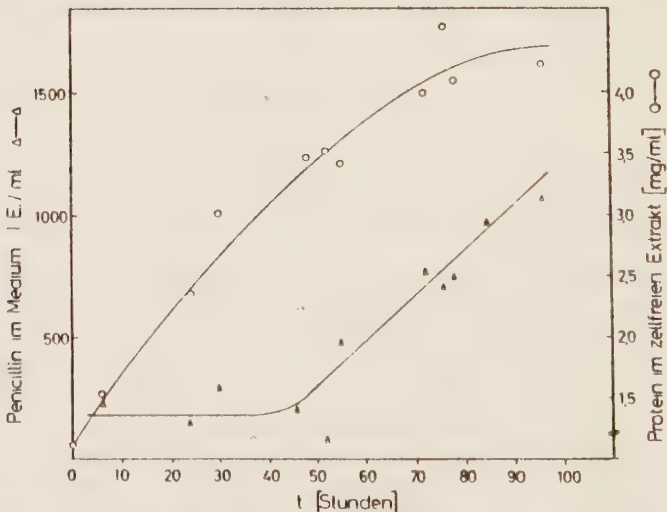


Abb. 4: Wachstum und Penicillinproduktion einer Kultur von *Penicillium chrysogenum* im 200 Liter Fermentor

die Penicillin-Produktion im 200 ltr.-Fermentor.

Einzelheiten der Züchtung sind im experimentellen Teil beschrieben.

2.2. Bestimmung der Aktivität von AAA-AMP-Ligase im ATP/ $^{32}\text{P}\text{P}_1$ -Austauschtest

Das Enzym katalysiert die reversible Aktivierung von Aminosäuren nach Gl. 12 :



Durch Einsatz von ^{32}P -Pyrophosphat wird in der Rückreaktion von Gl. 12 Radioaktivität in ATP eingebaut. Die Einbaurrate ist ein Maß für die enzymatische Aktivität des eingesetzten

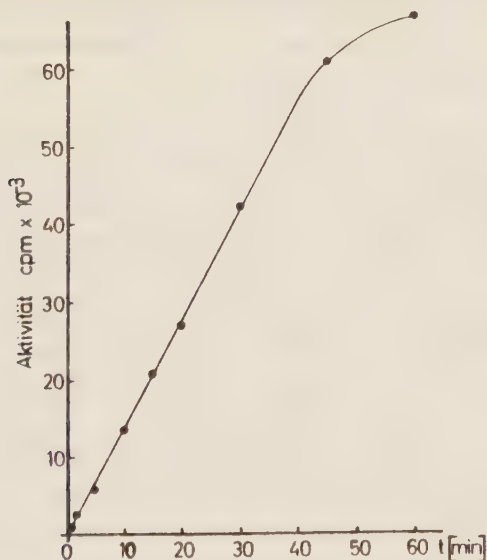


Abb. 5: Zeitabhängigkeit der ^{32}P -ATP-Bildungsrate im Standardtest. Zur Durchführung des Versuchs s. Legende zu Abb. 6 und S. 83

Proteins. Unter den Bedingungen des Standardtestes (s. Legende zu Abb. 6) ist die ^{32}P -ATP-Bildungsrate direkt proportional der Enzymkonzentration im Test (Abb. 6) und verläuft linear bis annähernd 40 min Inkubationsdauer (Abb. 5). 1 mE ist definiert als die Enzymmenge, welche die Bildung von 1 nMol ^{32}P -ATP pro Minute unter Standardbedingungen katalysiert. Spezifische Aktivität wird angegeben in mE/mg Protein.

2.3. Stabilität des Enzyms im zellfreien Extrakt

Voraussetzung für die Isolierung des Enzyms aus Extrakten von *Penicillium chrysogenum* ist eine möglichst weitgehende Stabilität im zellfreien Extrakt. Inkubiert man zellfreien Extrakt bei 0°C in Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, 1 mM DTT, pH 7,0), so fällt die Aktivität innerhalb von 2 h auf 50 % des Ausgangswertes ab (Abb. 7).

Variationen des pH-Wertes im Bereich von pH 6 bis pH 8, Verwendung von TEA bzw. Tris-Puffer statt Kaliumphosphat, sowie Zusatz von EDTA und PMSF brachten keine Stabilisierung des Enzyms. Erst die Verwendung von 10 % Glycerin und 30 % Ammoniumsulfat im ursprünglichen Puffer stabilisierte die Präparation: Selbst nach 22 Std. Inkubation bei 0°C war kein Aktivitätsverlust meßbar (Abb. 8). Entscheidend für die Stabilität des Enzyms ist die Kombination von Glycerin und AS. Wurde nur eine der beiden Substanzen zugesetzt, so wurde keine wesentliche Stabilisierung beobachtet.

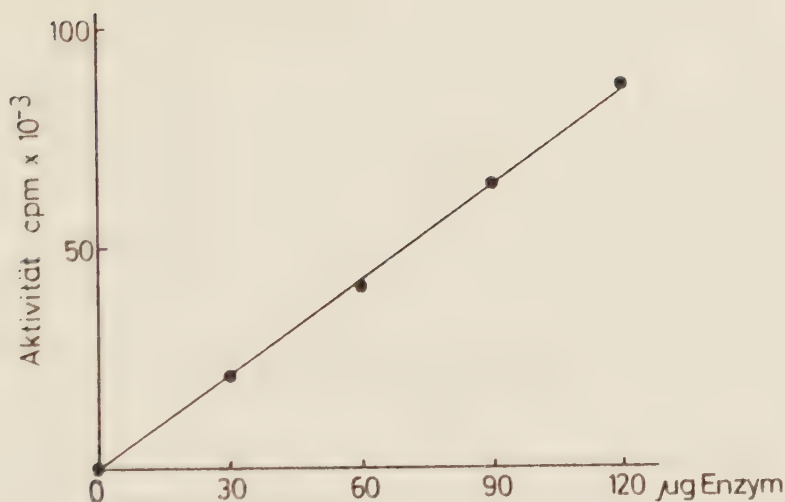


Abb. 6: Enzymabhängigkeit der ^{32}P -ATP-Bildungsrate im Standardtest.

Standardtest:

Die Inkubation enthielt in einem Gesamtvolumen von 110 µl: ATP (0,33 µMol), MgCl_2 (1,76 µMol), DL-2-AAA (0,55 µMol) bzw. L-Cys (0,3 µMol) bzw. L-Val (0,3 µMol), $\text{Na}_4^{32}\text{P}_2\text{O}_7$ (0,39 µMol, 0,1–0,5 µCi), DTT (0,2 µMol), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (4,4 µMol, pH 7,0), SA (0,11 mg) und AAA-AMP-Ligase.

Kontrollinkubationen enthielten keine Aminosäure. Die Inkubationen wurden nach 15 min bei 25°C mit 100 µl 15 % v/v HClO_4 (0,4 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) abgestoppt. Durch Zugabe von 20 µl einer 15 %igen w/v wässrigen Aktivkohlesuspension wurde ATP gebunden. Freies Pyrophosphat wurde durch Waschen der Kohle mit H_2O entfernt. Die in ATP eingebaute Radioaktivität wurde durch Hydrolyse mit 1 N HCl freigesetzt. Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot des Überstandes mit Unisolve gemischt und im Szintillationszähler gemessen (s. auch S. 82).

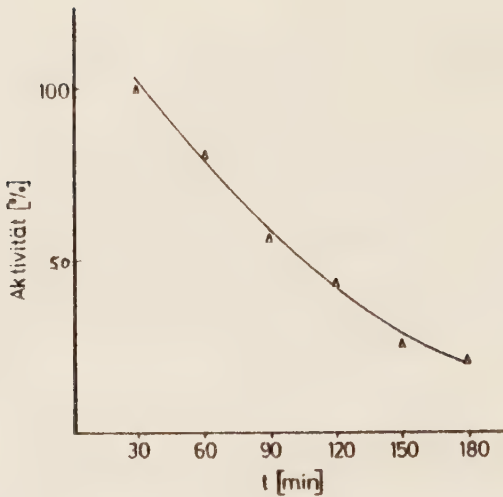


Abb. 7: Stabilität der AAA-AMP-Ligase im zellfreien Extrakt
3 g lyophilisiertes Mycel wurden mit 25 g Glasperlen und 30 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, 1 mM DTT, pH 7,0) im Zellhomogenisator nach Merckenschlager 1,5 min geschüttelt. Der 30 000 g Überstand (= zellfreier Extrakt) wurde bei 0 °C stehengelassen. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Aktivität von Aliquoten im Standardtest bestimmt.

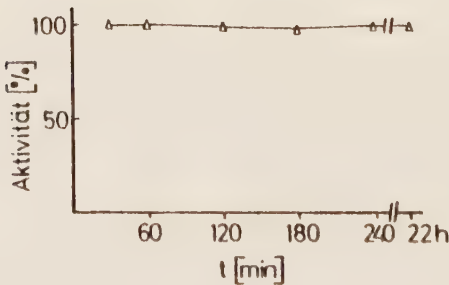


Abb. 8: Stabilität der AAA-AMP-Ligase im zellfreien Extrakt
Bedingungen siehe Legende zu Abb. 7; dem Puffer wurden jedoch Glycerin (10 % v/v) und Ammoniumsulfat (30 % d.S.) beige-mischt. Aliquote (100 µl) des zellfreien Extraktes wurden vor dem Aktivitätstest über Sephadex G 50 entsalzt, da Ammoniumsulfat den ATP/PP_i-Austausch hemmt (s. S. 33).

2.4. Isolierung der Aminoadipyl-AMP-Ligase

2.4.1. Zellfreier Extrakt

Zur Herstellung des zellfreien Extraktes wurden 90 g lyophilisiertes Mycel in Aufschlußpuffer (= Puffer A: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM DTT, 10 % v/v Glycerin, 30 % d.S. Ammoniumsulfat) suspendiert und mit Glasperlen in einem Zellhomogenisator nach Merckenschlager unter Kühlen auf 4° C aufgeschlossen. Durch Zentrifugieren erhielten wir den gelblich-trüben zellfreien Extrakt.

2.4.2. Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Der zellfreie Extrakt wurde bis 60 % der Sättigung mit festem Ammoniumsulfat versetzt. Die Zugabe des Ammoniumsulfats mußte hierbei sehr langsam erfolgen, um eine Übersäuerung der Lösung zu vermeiden. Der pH-Wert (7,0) wurde sorgfältig kontrolliert und mit 0,1 N Ammoniaklösung nachgestellt. Bei zu schneller Zugabe des Ammoniumsulfats können irreversible Aktivitätsverluste (bis zu 70 %) auftreten. Der durch Zentrifugation gewonnene Niederschlag wurde in Aufschlußpuffer aufgenommen; nicht gelöstes Material wurde durch Zentrifugation bei 60 000 rpm für 2 Stdn. entfernt.

2.4.3. Erste Chromatographie an DEAE-Sepharose-CL-6B

Die klare Proteinelösung aus 2.4.2. wurde nach Entsalzen über Sephadex G 50 an DEAE-Sepharose-CL-6B chromatographiert. Im AAA-, Cys-, Val-abhängigen ATP/PP₁ - Austausch aktives Protein wurde mit einem NaCl-Gradienten bei einer Leitfähigkeit von 1,2 - 3,1 x 10⁻² S von der Säule eluiert (Abb. 9).

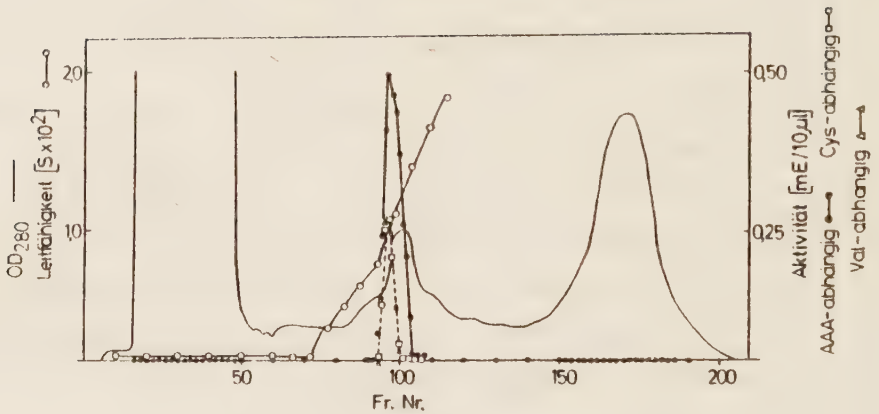


Abb. 9: Erste Chromatographie an DEAE-Sepharose-CL-6B

Die Säule (5 x 25 cm) war äquilibriumiert mit Puffer B (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM DTT, 10 % v/v Glycerin); 27 ml-Fractionen wurden aufgefangen. Gradient: 0-1 M NaCl in Puffer B.

Die sehr gute Reproduzierbarkeit dieses Schrittes erlaubte es, das gewünschte Protein an der Leitfähigkeit der einzelnen Fractionen zu erkennen. Da die Aktivitätsbestimmung der einzelnen Fractionen mehrere Stunden in Anspruch nimmt, und das Enzym unter diesen Bedingungen relativ instabil ist, konnten auf diese Weise die einzelnen Fractionen schnell und ohne allzu großen Aktivitätsverlust vereinigt und mit Ammoniumsulfat bis 70 % der Sättigung versetzt werden.

2.4.4. Chromatographie an Hydroxylapatit

Das gefällte Protein aus 2.4.3. wurde in Puffer B (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM DTT, 10 % v/v Glycerin) aufgenommen, über Sephadex G 50 entsalzt und an Hydroxylapatit chromatographiert. Wie Abb. 10 zeigt, wird bei diesem Schritt Aminoacidpensäure-aktivierendes Protein von Cystein- und Valin-aktivierendem Protein abgetrennt. Im Aminoacidpensäure-abhängigen ATP/PP₁-Austausch aktive Fraktionen wurden vereinigt und bis 70 % der Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt. Der zentrifugierte Niederschlag wurde in Puffer B gelöst.

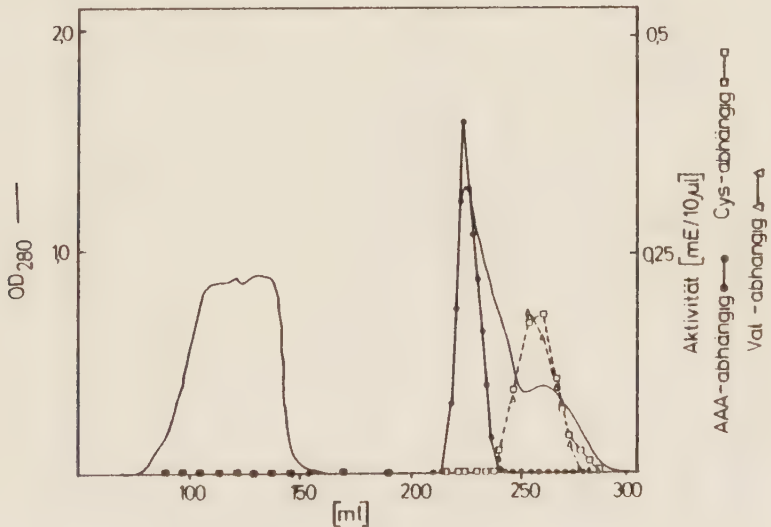


Abb. 10: Chromatographie an Hydroxylapatit
Die Säule (5 x 25 cm) war äquilibriert mit Puffer B.
Aktives Protein wurde mit Puffer C (300 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM DTT, 10 % v/v Glycerin) eluiert.

2.4.5. Filtration über Sepharose-CL-6B

Die klare Proteinlösung aus 2.4.4. wurde über eine Sepharose-CL-6B Säule filtriert. Die aktives Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt (Abb. 11). An diesem Punkt der Anreicherung ist die Aktivität des Enzyms über mindestens 6 h bei 4° C stabil.

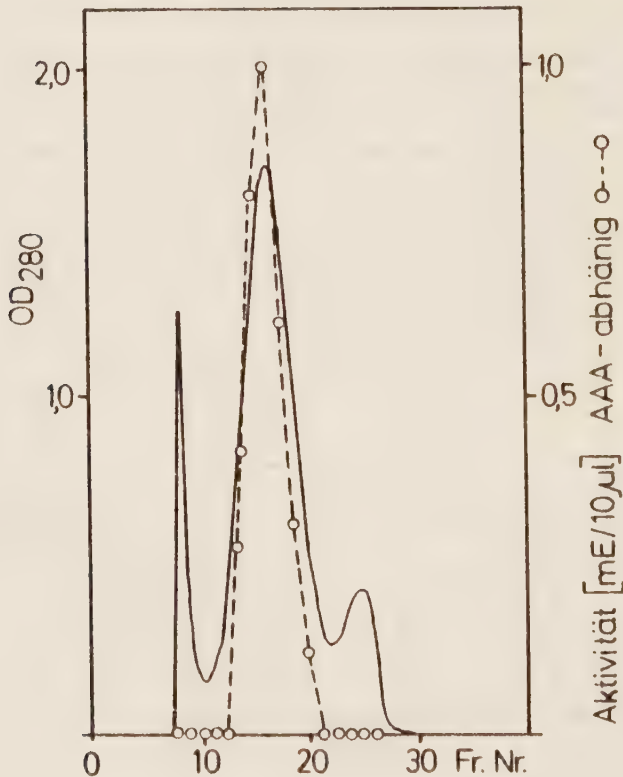


Abb. 11: Filtration über Sepharose-CL-6B

Die Säule war äquibriert mit Puffer B; 5 ml Fraktionen wurden aufgefangen.

2.4.6. Zweite Chromatographie an DEAE-Sepharose-CL-6B

Das Protein aus 2.4.5. wurde auf eine DEAE-Sepharose-CL-6B Säule gepumpt und mit einem Gradienten von 0-0,5 M NaCl eluiert (Abb. 12). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, bis 70 % der Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in Puffer D (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM DTT, 10 % v/v Glycerin, 90 % Ammoniumsulfat) suspendiert und bei -16°C aufgehoben. Die Aktivität der so gewonnenen Präparation nahm innerhalb von 6 Wochen nur um etwa 20 % ab.

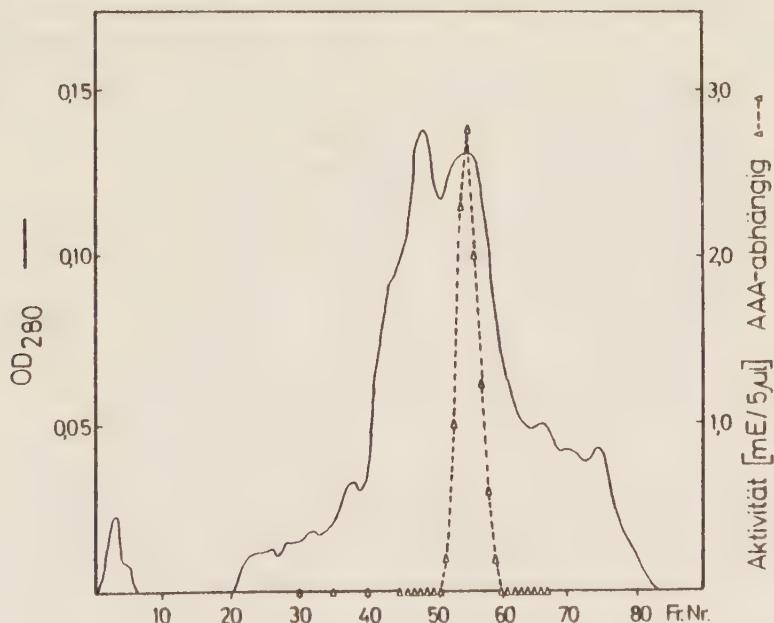


Abb. 12: Zweite Chromatographie an DEAE-Sepharose-CL-6B

Die Säule (2,5 x 60 cm) war äquiliбриert mit Puffer B; die Elution wurde durchgeführt mit einem Gradienten von 0-0,5 M NaCl in Puffer B.

Tabelle 1 zeigt die Zusammenfassung einer typischen Anreicherung. Weitere experimentelle Einzelheiten der Anreicherung sind auf Seite 77 beschrieben.

Tabelle 1: Zur Herstellung des zellfreien Extraktes wurden 90 g lyophilisiertes Mycel aufgeschlossen, wie auf S. 77 beschrieben.

ANREICHERUNG DER 6 - (DL - 2 - AAA) - AMP - LIGASE

REINIGUNGSSTUFE	VOLUMEN (ML)	PROTEIN (MG)	Ges.-Akt. (ME)	Spez.Akt. (ME/MG)	AUSBEUTE (%)	ANREICHERUNGS- FAKTOR
ZELLFREIER EXTRAKT (30% AS GESÄTTIGT)	1 620	10 800	21 600	2	100	1
60 % AS - PRÄZIPITAT	230	5 800	18 400	3,2	85	1,6
UZ - OS	200	4 000	18 300	4,6	85	2,3
1.CHROMATOGRAPHIE AN DEAE	150	620	7 500	12,1	35	6,1
HYDROXYLAPATIT - ELUAT	280	405	7 560	19	35	9,5
SEPHAROSE - CL - 6B - ELUAT	30	303	7 500	25	35	12,5
2.CHROMATOGRAPHIE AN DEAE (AS - GEFÄLLTES ELUAT)	2	54	6 770	125	31	62,5

3. PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DES ENZYMS

3.1. Bestimmung des Molekulargewichtes durch Gelpermeations-Chromatographie an Sephadex G-200

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde das Enzym über eine Sephadex G-200 Säule filtriert. Ferritin, Katalase, Aldolase und Cytochrom c liefen als interne Marker-Proteine mit. Die Chromatographie des Enzyms ohne Marker-Proteine ergab gleiche Ergebnisse.

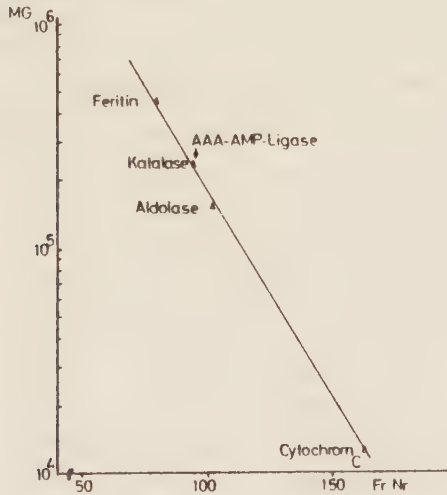


Abb. 13: Molekulargewichtsbestimmung der AAA-AMP-Ligase durch Gelpermeationschromatographie an Sephadex G-200

Säule: 1,5 x 145 cm, äquilibriert mit Puffer B
Eichproteine: Ferritin 450 000, Katalase 240 000,
Aldolase 158 000, Cytochrom c 12 500 Dalton.

Trägt man das Elutionsvolumen der einzelnen Marker-Proteine gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte auf, so erhält man eine Eichgerade, aus der sich das Molekulargewicht des Enzyms ablesen läßt (20). In drei verschiedenen Experimenten erhielten wir die Werte 220 000, 220 000 und 215 000 Dalton (Abb. 13).

3.2. Analytische Ultrazentrifugation

Zur Untersuchung des Sedimentationsverhaltens des Enzyms wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge Sedimentationsläufe durchgeführt. Der Zeitverlauf der Verschiebung der Grenzschicht zwischen sedimentierendem Protein und der Pufferlösung ist ein Maß für die Sedimentationskonstante des Proteins. Als interner Standard lief in einer "wedge"-Zelle Katalase mit. Abb. 14 und 15 zeigen den Abstand der Protein-Puffer-Grenze vom Rotationszentrum in Abhängigkeit von der Zentrifugationsdauer. Nach Gl. 13

$$S = \frac{dr / dt}{\omega^2 r} \quad \text{Gl. 13}$$

ω = Winkelgeschwindigkeit, r = Abstand der Protein-Puffergrenze vom Rotationszentrum

erhielten wir für Katalase den Wert $S_{app} = 6,52$, für AAA-AMP-Ligase $S_{app} = 4,90$.

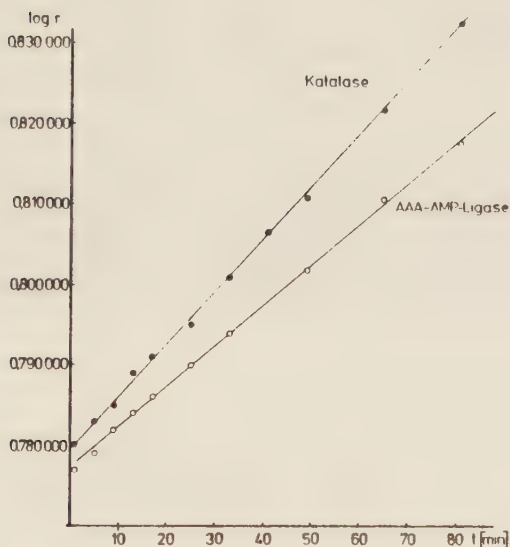


Abb. 14: Abstand der Protein-Puffergrenze vom Rotationszentrum in Abhängigkeit von der Zentrifugationsdauer

Durch den Vergleich mit dem tatsächlichen S-Wert für Katalase ($S = 11,2$) errechnet sich der tatsächliche S-Wert der AAA-AMP-Ligase zu $S = 8,4$. Die Bestimmung des Molekulargewichtes aus dem Sedimentationskoeffizienten erfordert die Kenntnis der Diffusionskonstanten und des partiellen spezifischen Volumens des Proteins. Durch Vergleich der bekannten S-Werte und Molekulargewichte verschiedener Pro-



Abb. 15: Analytische Ultrazentrifugation von AAA-AMP-Ligase (oben) und Katalase (unten, "wedge"-Zelle)
Experimentelle Einzelheiten s.S. 80

teine (21) kann jedoch das Molekulargewicht des Enzyms mit 176 000 Dalton abgeschätzt werden.

3.3. Zentrifugation im Rohrucker-Dichtegradienten

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen bietet das Verfahren von Martin und Ames (22). Das Protein mit unbekanntem Molekulargewicht wird in einem linearen Rohrucker-Gradienten zentrifugiert. Das Molekulargewicht ergibt sich durch Vergleich seiner Wanderungsgeschwindigkeit mit der von Eichproteinen bekannten Molekulargewichtes. Mit Katalase und Aldolase als Marker-Proteine erhielten wir für AAA-AMP-Ligase Molekulargewichte von

196 000 bzw. 180 000 Dalton (Abb. 16).

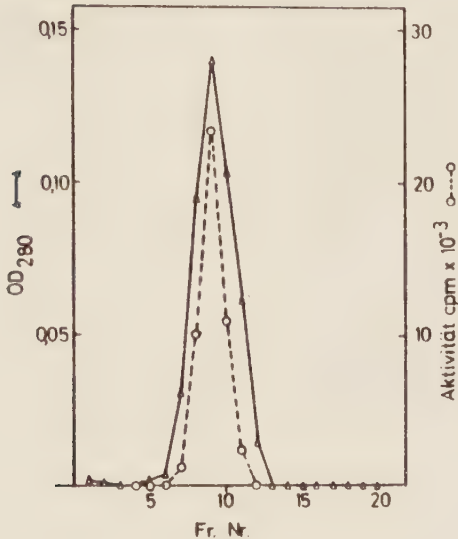


Abb. 16: Zentrifugation im kontinuierlichen Rohrzucker-Dichtegradienten

Rotor SW 41; Gradient 5-25 % Saccharose in Kaliumphosphatpuffer (20 mM, 1 mM DTT, pH 7,0).

Zentrifugationsdauer: 18 h bei 41 000 Upm

Weitere Einzelheiten s. S. 80

3.4. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen von frisch angereichertem Enzym ergaben eine Hauptproteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 70 000 Dalton (Abb. 17). Der Gehalt an Fremdprotein kann auf etwa 5-10 % geschätzt werden. Enzym, welches wie unter 2.4.6. beschrieben 4 Monate lang aufbewahrt worden war, ergab dagegen eine Hauptproteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 30 000 Dalton, und eine Reihe

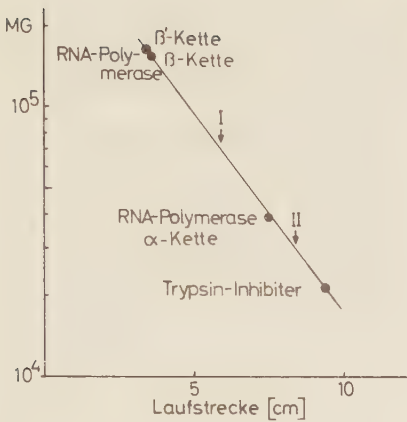


Abb. 17: SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
Gradientengel 5-25 %, variiert nach Lämmli (s.S. 81)
I : Frisch angereicherte AAA-AMP-Ligase
II : 4 Monate in Puffer D (s.S. 19) aufbewahrtes
Enzym

von Banden mit noch kleinerem Molekulargewicht. Diese Beobachtung deutet auf eine proteolytische Aktivität als Verunreinigung der Enzympräparation hin.

3.5. Isoelektrischer Punkt des Enzyms

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde das Protein in Anwesenheit von Ampholyten (Polyamino-polycarbonsäuren, pH 4-10) in einem Rohrucker-Dichtegradienten einer Elektrofokussierung unterworfen. Nach ca. 20 Stdn. war das Protein als scharfe, ausgeflockte Bande in der Säule zu sehen. Durch

sehr langsames Abzapfen des Gradienten gelang es, die Proteinbande ohne Verschmieren aus der Säule zu eluieren. Nach Neutralisation der einzelnen Fraktionen ging das Protein größtenteils wieder in Lösung; nach Entfernen denaturierten Materials durch Zentrifugation konnte die Aktivität in den einzelnen Fraktionen bestimmt werden. Die Aktivitätsausbeute schwankte zwischen 50 und 65 %. Nach Abb. 18 erhielten wir für den isoelektrischen Punkt des Enzyms den Wert $pI = 5,6$.

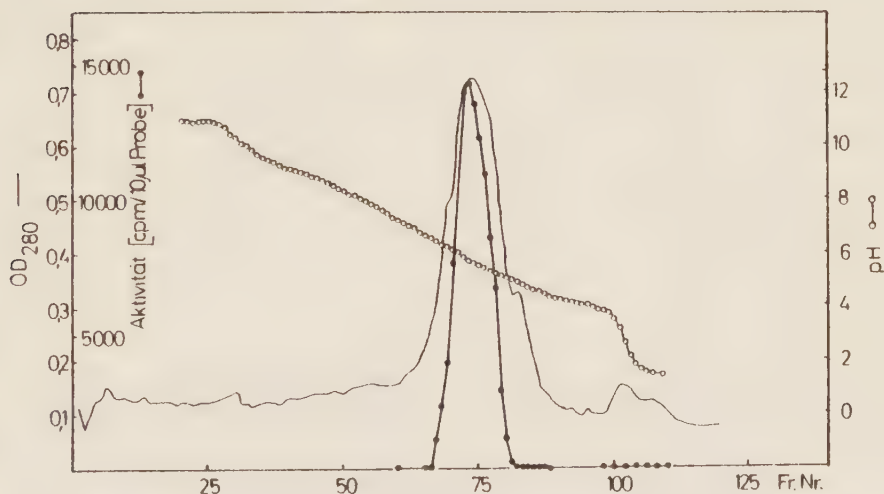


Abb. 18: Isoelektrische Fokussierung der AAA-AMP-Ligase in einer 110 ml Fokussiersäule
Experimentelle Einzelheiten siehe Text und S. 81

3.6. Stabilität des gereinigten Enzyms

3.6.1. Thermostabilität des Enzyms

Das Enzym kann bei 0°C in Kaliumphosphat-Puffer (20 mM, pH 7,0) unter Zusatz von 1 mM DTT und 10 % (v/v) Glycerin bis zu 6 Stdn. ohne Aktivitätsverlust inkubiert werden. Bei 25°C zeigte sich unter sonst gleichen Bedingungen nach etwa 60 min ein deutlicher Aktivitätsabfall, während bei 37°C schon nach 30 min Inaktivierung beobachtet wurde (Abb. 19).

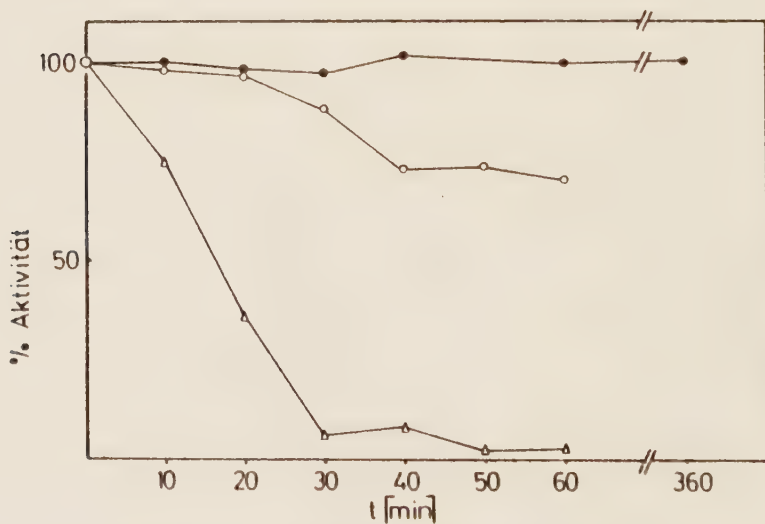


Abb. 19: Stabilität gereinigter AAA-AMP-Ligase bei 0°C (●—●), 25°C (○—○) und 37°C (△—△)

Je 0,2 mg Enzym wurden in Puffer B bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Aktivität von Aliquoten der Inkubation im Standardtest bestimmt.

3.6.2. Abhängigkeit der Stabilität vom pH-Wert

Die Stabilität des Enzyms ist stark abhängig vom pH-Wert. Abb. 20 zeigt, daß schon nach 50 min Inkubation des Proteins bei pH 6,0 und 0°C ein Aktivitätsverlust von etwa 40 % resultiert. Aus diesem Grund wurde während aller Arbeiten mit dem Enzym der pH-Wert genau bei pH = 7,0 gehalten. Übersäuerung der Proteinlösung, etwa durch Zugabe von Ammoniumsulfat, führte zu irreversiblen Aktivitätsverlusten.

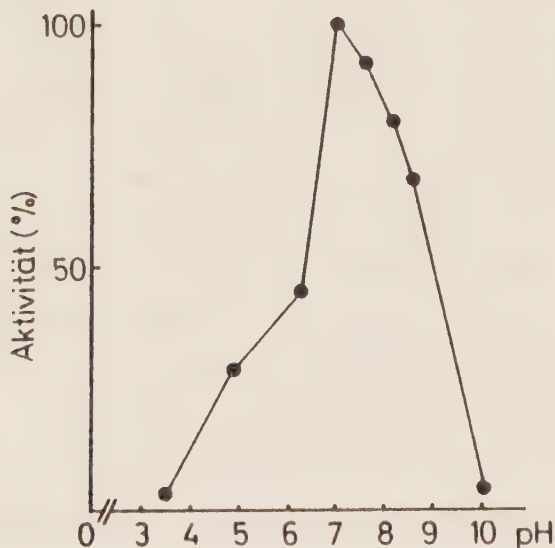


Abb. 20: Stabilität gereinigter AAA-AMP-Ligase bei verschiedenen pH-Werten

Je 0,1 mg Enzym wurde in 200 μ l Puffer B (mit 0,05 N NaOH bzw. 0,05 N HCl auf die angegebenen pH-Werte eingestellt) 60 min bei 0°C inkubiert. Die einzelnen Proben wurden neutralisiert; die Aktivität von Aliquoten wurde im Standardtest bestimmt.

3.6.3. Beeinflussung der Stabilität durch Salze und verschiedene Puffergemische

Wie unter 3.6.1. erwähnt, konnte das Protein mehrere Stunden lang bei 0°C in Puffer B ohne Aktivitätsverlust gehalten werden. Der Zusatz von Ammoniumsulfat bis 30 % der Sättigung oder NaCl (1 M) hatte keinen Einfluß. Die Konzentration des Puffers konnte ohne nachteilige Folgen im Bereich von 5 mM bis 300 mM variiert werden; die Verwendung von TEA- oder Tris-HCl-Puffer statt Kaliumphosphat hatte keinen Effekt.

Für die längere Aufbewahrung des Enzyms ist Puffer A jedoch nicht geeignet; nach 1 Woche bei 0°C waren nur noch 2-5 % der ursprünglichen Aktivität nachweisbar. Erst durch Zusatz von Ammoniumsulfat bis 90 % der Sättigung und Aufbewahren der Enzymsuspension bei -16°C konnte das Protein stabilisiert werden. Wir beobachteten nach 6 Wochen einen Aktivitätsverlust von maximal 20 %.

3.7. Reinheitskriterien

Das Verhalten des Proteins während der Zentrifugation im Rohrucker-Dichtegradienten zeigt Abb. 16. Die symmetrische Verteilung des Proteins und der Aktivität deutet auf eine weitgehend homogene Proteinpräparation hin. Lediglich während eines analytischen UZ-Laufes (Abb. 15) wurde eine schneller wandernde Proteinbande sichtbar, deren Intensität jedoch maximal 5-10 % der gesamten Proteinmenge entspricht.

Die unsymmetrische Verteilung des Proteins während des UZ-Laufes ist möglicherweise auf Dissoziation in Untereinheiten zurückzuführen. Während der Zentrifugation im Rohrzucker-Dichtegradienten wurde eine solche Dissoziation nicht beobachtet. Es ist daher anzunehmen, daß Saccharose die Struktur des Enzyms stabilisiert. Dies stimmt überein mit der Beobachtung, daß die Aktivität des Enzyms über mehrere Wochen voll erhalten bleibt, wenn es mit 15 % Saccharose in Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7,0, 1 mM and DTT) bei -20°C eingefroren wird. Ohne Zusatz von Saccharose geht die Aktivität unter sonst gleichen Bedingungen innerhalb 48 Stdn. vollständig verloren.

4. KATALYTISCHE EIGENSCHAFTEN DER AAA-AMP-LIGASE

4.1. ATP/PP₁ - Austausch

Die Aktivierung von Aminosäuren gemäß Gl. 14



ist weit verbreitet. Bei der Protein-Biosynthese werden die reaktiven Aminosäure-adenylate von den entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen auf die spezifischen tRNAs unter Freisetzung von AMP übertragen. Darüber hinaus findet man diese Art der Aktivierung von Aminosäuren bei der Biosynthese vieler Peptidantibiotika, wie zum Beispiel Gramicidin S (18), Bacitracin (23), Tyrocidin (24) und Edein (25). Akzeptoren für die aktivierten Aminosäuren sind hier Thiolgruppen des aktivierenden Enzyms.

Das in dieser Arbeit beschriebene Enzym katalysiert die Aktivierung von Amino adipinsäure nach obigem Schema; allerdings wird die aktivierte Aminosäure nicht auf eine integrale Thiolgruppe übertragen (s.S.63). Durch Einsatz von radioaktiv markiertem ³²P-Pyrophosphat wird in der Rückreaktion von Gl. 14 Radioaktivität in ATP eingebaut. Die Einbaurrate ist dann ein Maß für die enzymatische Aktivität des eingesetzten Proteins.

4.1.1. Abhängigkeit der ^{32}P -ATP-Bildungsrate von der eingesetzten Enzymmenge und von der Dauer der Inkubation

Abb. 6 zeigt die Abhängigkeit der ^{32}P -ATP-Bildung von der eingesetzten Enzymmenge. Unter den im experimentellen Teil genannten Bedingungen verläuft die Bildung von ^{32}P -ATP linear im Bereich von 30 μg bis 120 μg Enzym. Wurde die Inkubation ohne Zusatz von Amino adipinsäure durchgeführt, beobachteten wir unspezifische Austauschraten, die - je nach Enzympräparation - 0,5 bis maximal 5 % der Amino adipinsäure-abhängigen Aktivität betrugen. Abb. 5 zeigt die Abhängigkeit der ^{32}P -ATP-Bildung von der Dauer der Inkubation. Die Reaktion verläuft bis annähernd 40 min linear.

4.1.2. Einfluß von pH-Wert, Puffer-Konzentrationen und Salzkonzentrationen auf den ATP/PP₁-Austausch

Die Aktivität des Enzyms im Austauschtest ist ebenso wie seine Stabilität (vergl. 3.6.2.) stark vom pH-Wert der Inkubation abhängig. Auf Abb. 21 erkennt man einen relativ schmalen Aktivitätsgipfel um pH 7,0.

Den Einfluß der Puffer-Konzentration in der Testmischung auf die Aktivität des Enzyms zeigt Abb. 22. Entsprechend dem Kurvenverlauf wurde im Standardtest eine Puffer-Konzentration von 40 mM Kaliumphosphat gewählt. TEA-Puffer zeigte in etwa die gleichen Ergebnisse.

NaCl , Na_2SO_4 , NH_4Cl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hemmen den ATP/PP₁-Austausch schon bei Konzentrationen von 100 mM bis 200 mM um 50 %. Dies hat zur Folge, daß Ammoniumsulfat gefälltes

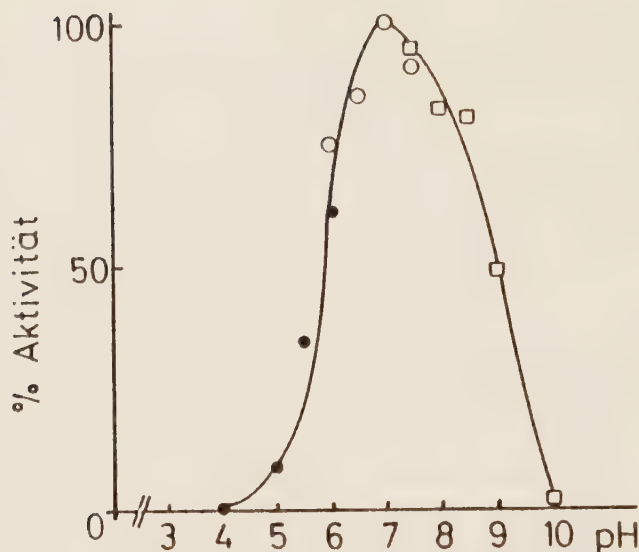


Abb. 21: Einfluß des pH-Wertes der Inkubation auf die ^{32}P -ATP-Bildung im Standardtest

Die Aktivität von je 0,01 mg AAA-AMP-Ligase wurde im Standardtest mit folgenden Puffergemischen gemessen:

pH 4,0 - 6,0 : Citratpuffer	45 mM	●—●
pH 6,0 - 7,5 : Kaliumphosphat	45 mM	○—○
pH 7,5 - 9,0 : Tris-HCl	45 mM	□—□

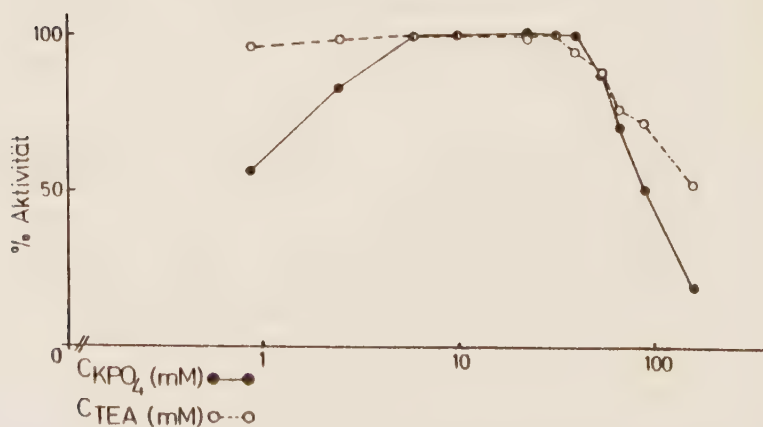


Abb. 22: Einfluß der Konzentration von Kaliumphosphat und Tri-äthanolamin-Puffer auf die ^{32}P -ATP-Bildungsrate im Standardtest

Enzym vor dem Test über Sephadex G-50 entsalzt werden muß. Dialysieren der Enzymlösung gegen Ammoniumsulfat-freien Puffer bei 4°C führte innerhalb von 60 min zu irreversiblen Aktivitätsverlusten. Als optimale MgCl_2 -Konzentration im Test fanden wir 16 mM (Abb. 23). MnCl_2 kann MgCl_2 nicht ersetzen; unter sonst gleichen Bedingungen sank die Aktivität auf ca. 7 % des ursprünglichen Wertes ab.

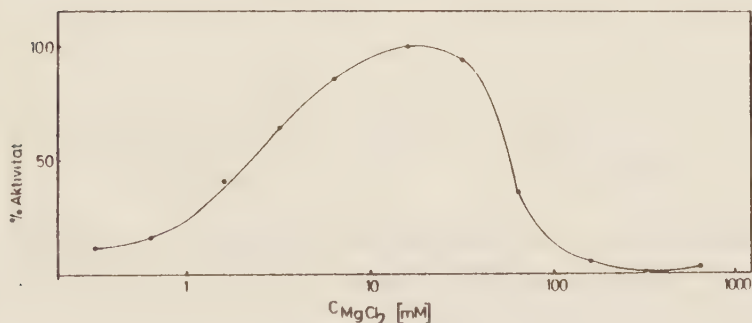


Abb. 23: Einfluß der MgCl_2 -Konzentration auf die Aktivität des Enzyms im Standardtest
ATP wurde als Natriumsalz in einer Konzentration von 3,0 mM eingesetzt.

4.1.3. Abhängigkeit des ATP/PP_1 -Austausches von den Substrat-Konzentrationen

Die Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms im Austauschtest von der Konzentration der Substrate DL-2-Aminoadipinsäure, ATP und Pyrophosphat gehorcht einer normalen Michaelis-Menten Kinetik. Die Abb. 24-26 zeigen die Lineweaver-Burk Diagramme für die drei Substrate. Die Michaelis-Konstanten ergeben sich hieraus zu $K_M = 2,8$ mM für DL-AAA, $K_M = 1,2$ mM für ATP und $K_M = 1,1$ mM für PP_1 . Sie liegen damit in der gleichen

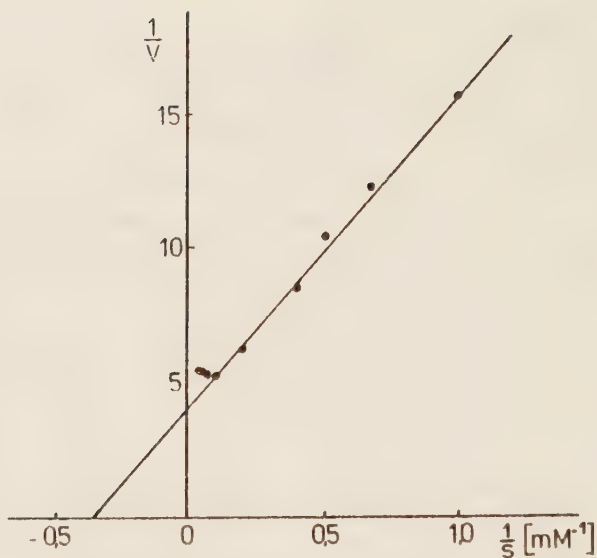


Abb. 24: Abhängigkeit der Aktivität der AAA-AMP-Ligase im Standardtest von der AAA-Konzentration; Darstellung nach Lineweaver und Burk

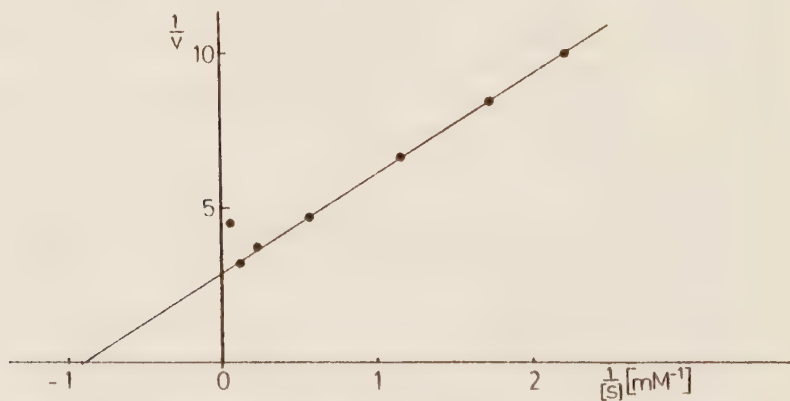


Abb. 25: Abhängigkeit der Aktivität der AAA-AMP-Ligase im Standardtest von der PP_1 -Konzentration; Darstellung nach Lineweaver und Burk

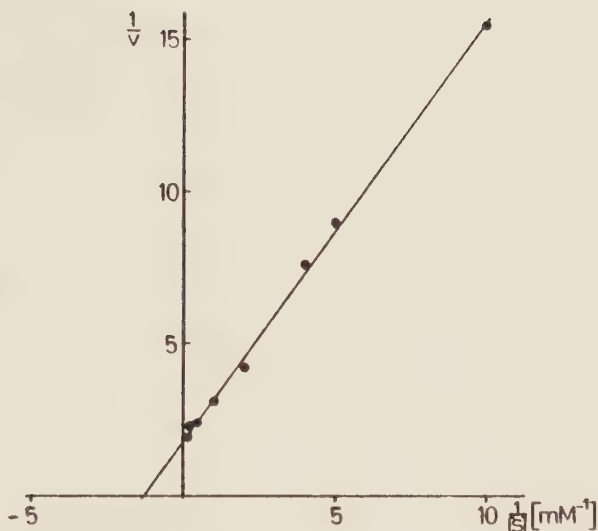


Abb. 26: Abhängigkeit der Aktivität der AAA-AMP-Ligase im Standardtest von der ATP-Konzentration; Darstellung nach Lineweaver und Burk; ATP wurde als Mg-Salz variiert.

Größenordnung wie die Werte, die für Gramacidin S-Synthetase (26) und für das "Aminoadipinsäure-Reduktase-System" von Sagisaka und Shimura (15) gemessen wurden.

4.1.4. Spezifität des Enzyms für Aminosäuren und Nucleosid-5'-Triphosphate

Das Enzym zeigt eine hohe Spezifität für 2-Aminoadipinsäure. L-Homoglutamin, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin sowie N-4-Methoxybenzyloxycarbonyl-DL-2-Aminoadipinsäure und N-4-Methoxybenzyloxycarbonyl-DL-2-Aminoadipinsäure-1(4-Methoxybenzyl)ester - jeweils 3 mM im Test - wurden nicht als Substrate angenommen. Ob die Amino-

gruppe der 2-Aminoadipinsäure tatsächlich erforderlich ist für die Bindung des Substrates an das Enzym, kann schlecht beurteilt werden, da der Substituent am Stickstoff außerordentlich raumerfüllend ist, und somit auch eine sterische Hinderung vorliegen kann.

Eine ähnlich hohe Spezifität zeigt das Enzym für ATP. GTP, UTP und CTP werden unter den Bedingungen des Standardtestes nicht als Substrat akzeptiert.

4.1.5. Hemmung des ATP/PP₁-Austausches

Um eine volle Aktivität im ATP/PP₁-Austausch zu gewährleisten, muß gefordert werden, daß das gebildete Aminoadipyl-adenylat am Enzym gebunden bleibt und nicht hydrolysiert wird. Unter diesem Gesichtspunkt wurden CoASH, Pantethein, N-Acetyl-Cysteamin und Hydroxylamin als mögliche Akzeptoren für die aktivierte Aminoadipinsäure auf ihre hemmende Wirkung im Austausch-Test untersucht.

Abb. 27 zeigt, daß 1 M NH₂OH in der Testinkubation eine fast vollständige Hemmung der ³²P-ATP-Bildung bewirkt. Vorinkubation des Enzyms mit NH₂OH unter Testbedingungen und anschließendes Entsalzen der Probe lieferte voll aktives Protein. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die verminderte ³²P-ATP-Bildung auf das Abfangen der aktivierten Aminosäure durch NH₂OH zurückzuführen ist und nicht auf eine Schädigung des Enzyms. Wie später (s.S. 43) gezeigt werden wird, konnte in einer solchen Inkubation tatsächlich Aminoadipinsäure-6-hydroxamat nachgewiesen werden.

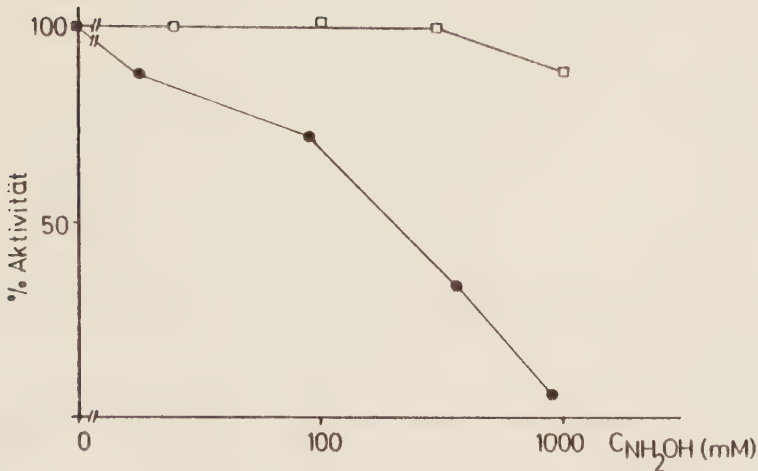


Abb. 27: Hemmung der ^{32}P -ATP-Bildung im Standardtest durch NH_2OH

Zur Inkubationsmischung des Standardtests wurde bidestilliertes und mit HCl neutralisiertes NH_2OH in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. $\bullet$ — $\bullet$

Kontrollinkubation: AAA-AMP-Ligase wurde unter Standardbedingungen (s.S. 82) mit NH_2OH inkubiert, über Sephadex G 50 entsalzt und im Standardtest gemessen. $\square$ — $\square$

Den Einfluß von CoASH, Pantethein und N-Acetylcysteamin auf die ^{32}P -ATP-Bildung verdeutlicht Abb. 28. Die Kontrolle (vergl. die Legende zur Abb.) zeigt wiederum, daß die zugesetzten Hemmstoffe offensichtlich als Akzeptoren für die aktivierte Aminosäure fungieren.

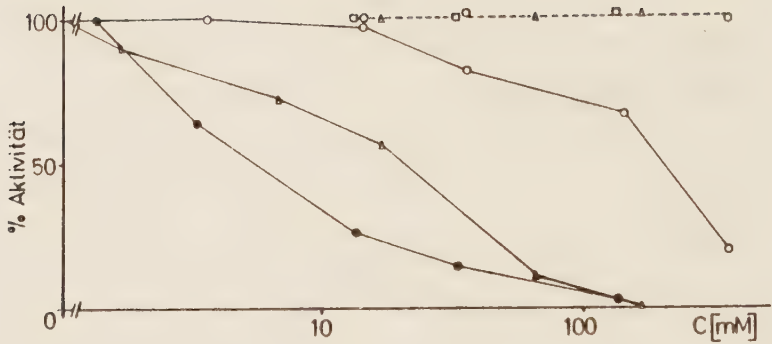


Abb. 28: Hemmung der ^{32}P -ATP-Bildung im Standardtest durch CoASH, Pantethein und N-Acetylcysteamin

Zur Versuchsdurchführung vergleiche Legende zu Abb. 27.

	Kontrollinkubationen	
CoASH	● — ●	□ - - - □
Pantethein	△ — △	△ - - - △
N-Acetylcysteamin	○ — ○	○ - - - ○

Nach Zusatz von anorganischer Pyrophosphatase aus Hefe (0,5 U/Inkubation) zum Standardtest konnte keinerlei Einbau von Radioaktivität in ATP mehr nachgewiesen werden; Hemmung der Pyrophosphatase mit KF hob diesen Effekt (Abb. 29) vollständig auf. Das Vorliegen von intaktem Pyrophosphat ist also - wie zu erwarten war - zwingende Voraussetzung für die Reaktion.

Inkubation des Enzyms mit JAA (0,01 - 1 mM, 60 min bei 0°C, pH-Werte der Inkubation von 6,0 - 8,0) ergaben keinerlei Aktivitätsverlust gegenüber Kontrollinkubationen ohne JAA.

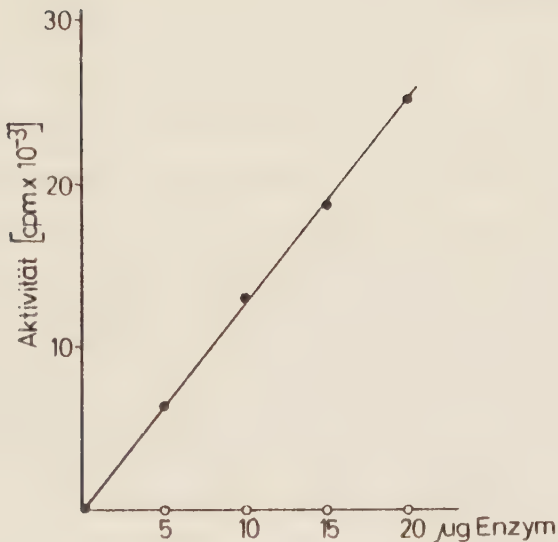


Abb. 29: Hemmung der von AAA-AMP-Ligase katalysierten ^{32}P -ATP-Bildung im Standardtest durch anorganische Pyrophosphatase; zur Inkubation wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ 0,5 U Pyrophosphatase (o—o) bzw. Pyrophosphatase und gleichzeitig KF (7 mM, ●—●) zugesetzt.

Die Beteiligung einer Thiolgruppe an der Aktivierungsreaktion ist daher sehr unwahrscheinlich.

4.2. ^{14}C -Aminoadipinsäure-6-hydroxamat-Bildung; Aminoadipinsäure-abhängige ATP-Spaltung

Vorbemerkung:

Die Katalyse eines Aminosäure-abhängigen ATP/PP_1 -Austausches durch die AAA-AMP-Ligase setzt die Bildung eines unter Testbedingungen relativ stabilen Enzym-Aminoadipyl-Adenylat-Komplexes

nach Gl. 15 voraus.



Nach Zusatz von Enzym sollten also nur stöchiometrische Mengen Pyrophosphat gebildet werden, solange kein Akzeptor für die aktivierte Aminosäure vorhanden ist. Wir konnten dementsprechend freies Pyrophosphat im optischen Test (27) nicht nachweisen. Durch Zusatz von anorganischer Pyrophosphatase versuchten wir, das Gleichgewicht der Reaktion stark auf die rechte Seite von Gl. 15 zu verschieben, doch konnte auch auf diese Weise die Bildung von freiem Phosphat im optischen Test (27) nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich ist die Dissoziationskonstante des E-AMP-AAA-Komplexes zu klein. Die Anwesenheit von 1 M Hydroxylamin und 20 I.U. anorganische Pyrophosphatase im Test brachte auch keinen Erfolg. Weder AMP noch freies Phosphat ließen sich im optischen Test nachweisen. Es zeigte sich schließlich, daß die Geschwindigkeit der Übertragung von aktivierter Aminosäure auf Hydroxylamin nach Gl. 16 zu gering war, um im optischen Test erfaßt werden zu können.



Der Nachweis des gebildeten Hydroxamats durch Messung der Absorption des Fe-III-Komplexes bei 535 nm (28) gelang aus dem gleichen Grunde nicht.

Als den optischen Methoden weit überlegen in der Nachweisesempfindlichkeit boten sich an:

- 1) Bildung von $^{14}\text{C-AAA-NHOH}$ aus $^{14}\text{C-AAA}$, ATP und NH_2OH ;
- 2) Freisetzung von $^{32}\text{PP}_1$ aus $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$.

4.2.1. Enzymatische Synthese von ^{14}C -Aminoadipinsäure-6-hydroxamat

Die in den folgenden Versuchen verwendete U- ^{14}C -DL-2-Amino-adipinsäure wurde von uns durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie von radioaktiven Verunreinigungen befreit (s.S.89).

Die Inkubationsmischung zum Nachweis der Bildung von ^{14}C -Amino-adipinsäure-hydroxamat wurde extrahiert, wie auf S.88 detailliert beschrieben. Der Extrakt, dem synthetisches DL-2-Aminoadipyl-6-hydroxamat (Synthese s.S.86) zugesetzt worden war, wurde durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie an einer "reversed-phase"-Säule aufgetrennt (Abb. 30). Die im

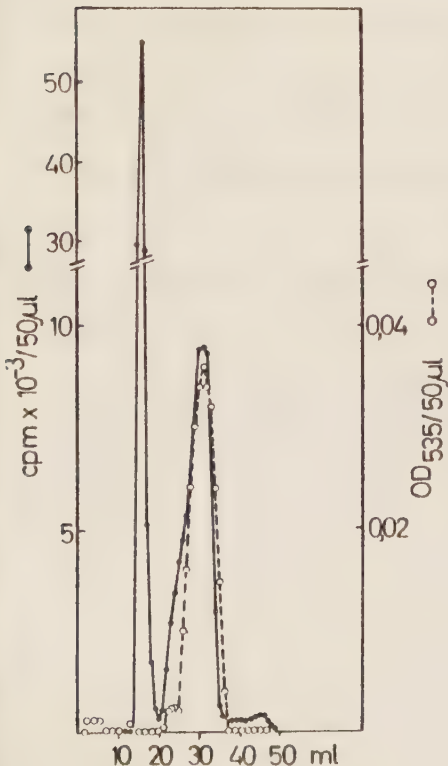


Abb. 30: Hochdruckflüssigkeits-chromatographie der Inkubationsmischung zur enzymatischen Synthese von ^{14}C -AAA-hydroxamat.

RP-C18 Reversed-Phase Säule (1x25 cm), Durchflußgeschwindigkeit: 5 ml/min, Elutionsmittel: 5 % v/v Methanol (0,37 mM an HCl) / 95 % 0,37 mM HCl.

Es wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen; 50 µl Aliquote wurden mit 10 ml Unisolve und 450 µl H₂O versetzt und im Szintillationszähler gemessen.

Hydroxamat wurde durch Messen der Absorption des Fe-III-Komplexes bei 535 nm bestimmt.

Weitere Einzelheiten s.S. 88

Fe-III-Test positiven Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und über Hochspannungs-Papier-Elektrophorese weiter gereinigt. Unter den gegebenen Bedingungen wurden Amino adipinsäure-hydroxamat und freie Amino adipinsäure klar voneinander getrennt. Besprühen des Chromatogramms mit Ninhydrin ergab zwei Flecken in der Position von Amino adipinsäure und Amino adipinsäure-6-hydroxamat. Besprühen des Chromatogramms mit Fe-III-Reagenz (s.S. 86) ergab nur einen Fleck in der Position des Hydroxamats. Die radioaktiven Gipfel stimmten exakt mit den angefärbten Flecken überein (Abb. 31).



Abb. 31: Hochspannungs-Papierelektrophorese des über HPLC (s. Abb. 30) gereinigten ^{14}C -AAA-Hydroxamats
Elektrophoresepuffer: Pyridin/Acetat, pH 4,5, 50 mM an Acetat; Laufzeit: 2 h bei 50 V/cm
Die Lage radioaktiver Flecken wurde im Papierstreifenscanner nachgewiesen; Aminosäuren wurden mit Ninhydrin, Hydroxamat mit Fe-III-Reagens (s.S.86) angefärbt.

Diese Übereinstimmung und das Verhalten des enzymatisch gebildeten Produktes während der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie werten wir als Beweis für die Identität des Reaktionsproduktes mit authentischer Vergleichssubstanz.

Hydrolyse des vom Chromatogramm eluierten Produktes durch 18 Stdn. Erhitzen auf 120°C mit 6 N HCl und erneute Hochspannungs-Papierelektrophorese ergab nur einen Ninhydrin-positiven Fleck an der Stelle von Amino adipinsäure. Sämtliche nachweisbare Radioaktivität war in diesem Fleck enthalten. Kontrollinkubationen des Enzyms mit ^{14}C -Amino adipinsäure und Hydroxylamin ohne ATP ergaben keinerlei Veränderung der eingesetzten Amino adipinsäure. Radioaktivität wurde sowohl bei der Trennung der Inkubationsmischung durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie als auch bei der Hochspannungs-Papierelektrophorese ausschließlich an der Stelle von Amino adipinsäure gefunden (Abb. 32 und 33).

Die Geschwindigkeit der Hydroxamat-Bildung stimmte gut mit der Geschwindigkeit der enzymatisch katalysierten γ - ^{32}P -ATP-Spaltung überein (s.S.47). In drei Versuchen fanden wir Werte von 68.7 bis 70.6 pMol Hydroxamat-Bildung pro 15 min und mg Protein gegenüber 65 pMol ATP-Spaltung pro 15 min und mg Protein.

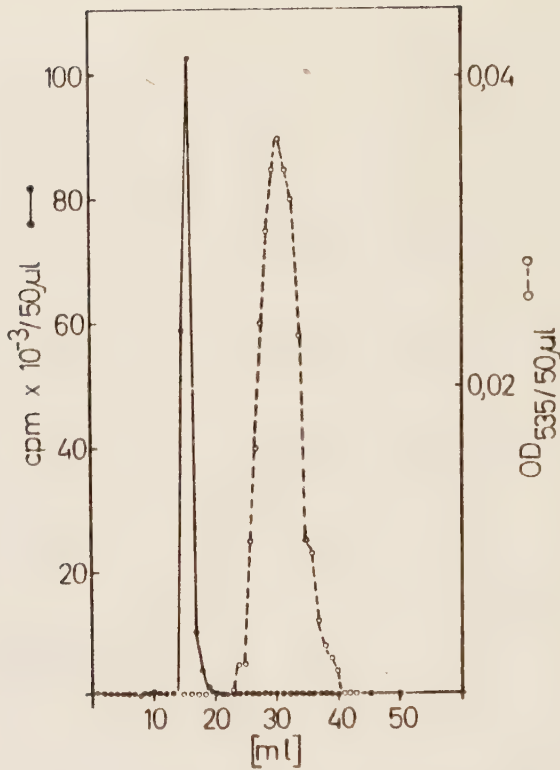


Abb. 32: Kontrollinkubation zur enzymatischen Synthese von ¹⁴C-AAA-Hydroxamat; Trennung über HPLC. Experimentelle Einzelheiten siehe Text und Legende zu Abb. 30



Abb. 33: Kontrollinkubation zur enzymatischen Synthese von ¹⁴C-AAA-Hydroxamat. Trennung über Hochspannungs-Papier-elektrophorese. Experimentelle Einzelheiten siehe Text und Legende zu Abb. 31

4.2.2. γ - 32 P-ATP-Spaltung

Hydroxylamin kann, wie oben gezeigt, als Akzeptor für die aktivierte Aminosäure dienen. Daneben ist auch CoASH als Akzeptor geeignet, und zwar in sehr viel geringeren Konzentrationen als Hydroxylamin (50 % Hemmung des ATP/PP_i-Austausches bei ca. 5 mM gegenüber ca. 200 mM bei NH₂OH, siehe Seite 39). Möglicherweise fungiert CoASH als Analagon eines natürlichen Akzeptors für die aktivierte Aminoacidpensäure. Abb. 34 zeigt,

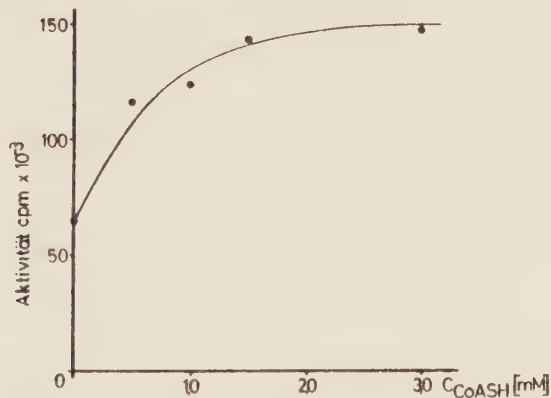


Abb. 34: Steigerung der Aktivität von AAA-AMP-Ligase im γ - 32 P-ATP-Spaltungstest durch CoASH

Die Inkubation enthielt in einem Gesamtvolumen von 110 μ l: TEA-Puffer (4,4 μ Mol, pH 7,0), γ - 32 P-ATP (50 pMol, 0,5 μ Ci), DL-2-AAA (0,55 μ Mol), DTT (0,22 μ Mol), CoASH (0-0,33 μ Mol), MgCl₂ (1,76 μ Mol), SA (0,11 mg), anorgan. PPase (2 U), AAA-AMP-Ligase (80 μ g).

Nach 15 min bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von HClO₄ abgestoppt, mit Aktivkohle versetzt, und Radioaktivität im Überstand gemessen, wie auf Seite 84 detailliert beschrieben. Kontrollinkubationen enthielten keine AAA.

daß CoASH die Geschwindigkeit der ATP-Spaltung um den Faktor 2,5 erhöht. Bei den folgenden Experimenten wurde daher mit 3 mM CoASH im Inkubationsansatz gearbeitet.

4.2.2.1. Abhängigkeit der γ - ^{32}P -ATP-Spaltung von der eingesetzten Enzymmenge und von der Dauer der Inkubation

Abb. 35 zeigt die Abhängigkeit der γ - ^{32}P -ATP-Spaltung von der eingesetzten Enzymmenge. Im Bereich von 10 μg bis 80 μg Enzym in der Inkubation ist die Geschwindigkeit der ATP-Spaltung direkt proportional der Enzymkonzentration.

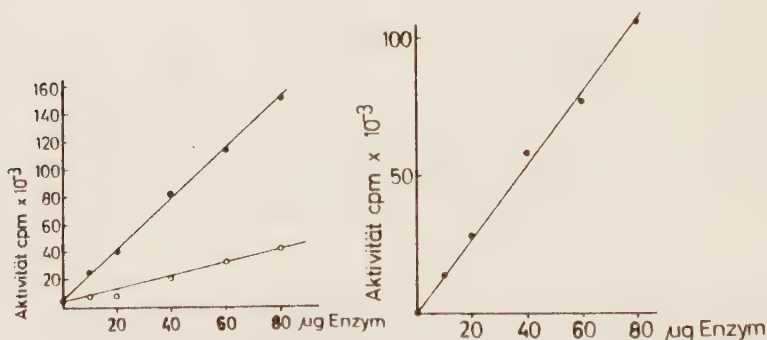


Abb. 35: Enzymabhängigkeit der γ - ^{32}P -ATP-Spaltung
Experimentelle Einzelheiten s.S. 84 und Legende zu
Abb. 34.

- a) ● — ●: mit AAA; ○ — ○: ohne AAA
b) AAA-abhängige ATP-Spaltung (diese Kurve entspricht der Differenz der beiden Kurven in a).

Den Zeitverlauf der Reaktion zeigt Abb. 36. Die ATP-Spaltung verläuft bis ca. 30 min linear.

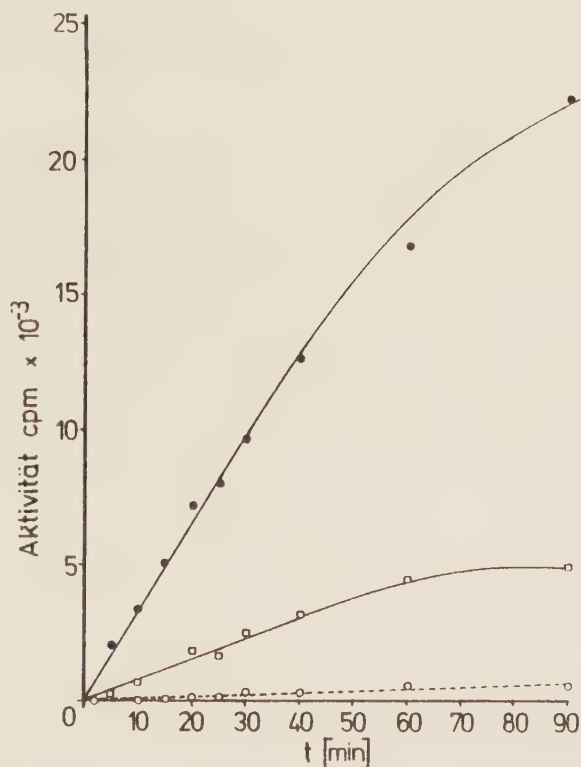


Abb. 36: Zeitabhängigkeit der γ -³²P-ATP-Spaltung

Experimentelle Einzelheiten s.S.85

● — ● mit AAA; □ — □ ohne AAA; ○ — — — ○ ohne
AAA-AMP-Ligase

4.2.2.2. Abhängigkeit der γ - ^{32}P -ATP-Spaltung von der Substratkonzentration

Im Unterschied zur ATP/PP_1 -Austauschreaktion ist die Amino-
adipinsäure-unabhängige Aktivität im ATP-Spaltungstest beträcht-
lich; sie erreicht ca 25 % des Aminosäure-abhängigen Umsatzes
(Abb. 35).

Die Abhängigkeit der ATP-Spaltung von der Amino-
adipinsäure-Konzentration zeigt Abb. 37. Der Verlauf der Kurve entspricht
wiederum einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik. Aus dem
Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 38) entnimmt man die Michaelis-
Konstante für Amino-
adipinsäure zu $K_M = 6,7 \text{ mM}$. Dies ent-
spricht in etwa dem Wert, der im ATP/PP_1 -Austauschtest gefun-
den wurde.

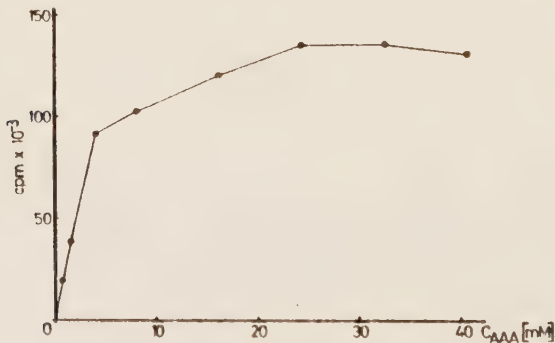


Abb. 37: Abhängigkeit der Aktivität von AAA-AMP-Ligase im
ATP-Spaltungstest von der AAA-Konzentration;
Darstellung nach Michaelis-Menten.

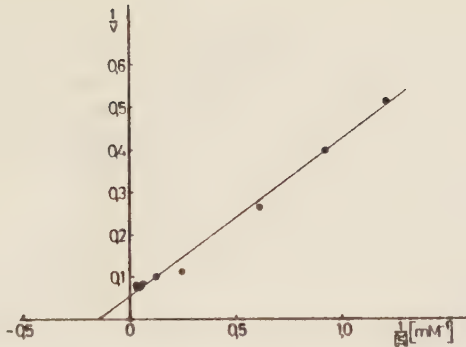


Abb. 38: Siehe Legende zu Abb. 37; Darstellung nach Lineweaver-Burk

Schwer zu erklären ist die enorme Differenz der K_M -Werte für ATP. Im Austauschtest wurde $K_M = 1,2 \text{ mM}$ gemessen (s. 4.1.3.), im ATP-Spaltungstest dagegen der Wert $K_M = 0,2 \mu\text{M}$ (Abb. 39), wobei schon bei ATP-Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$

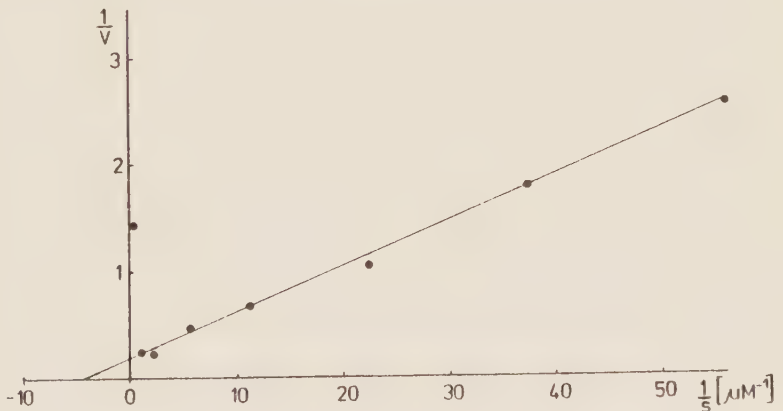


Abb. 39: Ermittlung von K_M für ATP im ATP-Spaltungstest
Darstellung nach Lineweaver und Burk

eine deutliche Hemmung des Enzyms beobachtet wurde. Möglicherweise bewirkt das im Spaltungstest zugesetzte CoASH eine Konformationsänderung des Proteins und damit eine stark erhöhte Affinität für ATP.

4.2.2.3. Nachweis von ^{32}P -Pyrophosphat im γ - ^{32}P -ATP-Spaltungstest

Die Katalyse eines Aminosäure-abhängigen ATP/PP₁-Austausches durch das Enzym erfordert die Abspaltung einer Pyrophosphatgruppe von ATP. Folgerichtig muß in Inkubationen des γ - ^{32}P -ATP-Spaltungstestes radioaktives ^{32}P -Pyrophosphat gebildet werden.

Diese Annahme konnten wir bestätigen: Die Standard-Testmischung (ohne Pyrophosphatase!) wurde nach Inkubation wie üblich mit Aktivkohle behandelt, um nicht umgesetztes γ - ^{32}P -ATP zu entfernen. Nach Zusatz von Orthophosphat, Pyrophosphat und ATP als Träger wurde der Inkubationsüberstand der Papierchromatographie unterworfen. 98 % bis 99.5 % der Radioaktivität war an der Stelle von Pyrophosphat zu finden, der Rest wanderte mit ATP. In Orthophosphat war keinerlei Radioaktivität nachzuweisen (Abb. 40).

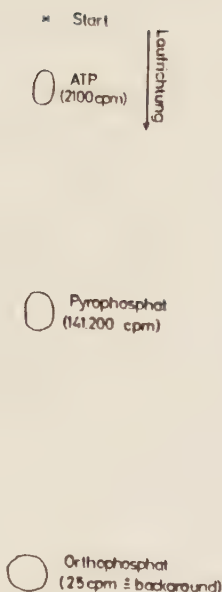


Abb. 40: Papierchromatographie eines γ - ^{32}P -ATP-Spaltungsansatzes zur Trennung von ATP, Orthophosphat und Pyrophosphat
Papier: Whatman 1 MM, Laufmittel: n-Butanol/n-Propanol/Aceton/Ameisensäure (80% w/v)/TCA (30 % w/v) wie 40/20/25/25/15 v/v.
100 ml Laufmittel enthielten 50 mg EDTA- Na_4 . Das Chromatogramm wurde absteigend für 20 h bei Raumtemperatur entwickelt.

4.3. ATP/ ^{14}C -ADP-Austausch

Die Aktivierung von Aminosäuren als Aminoacylphosphat, wie es z.B. für die Biosynthese von Glutathion beschrieben ist (19), kann in einem ATP/ADP-Austausch verfolgt werden. Nach Gl. 17



wird in der Rückreaktion der Aktivierung Radioaktivität aus ^{14}C -ADP in ATP eingebaut. Diese Austausch-Reaktion konnten wir mit unserem Enzym nicht nachweisen, obwohl wir sehr hohe Enzym-Konzentrationen (5-10 mg/Inkubation, s.S. 89, gegenüber 5-100 μg im ATP/PP $_1$ -Austauschtest) einsetzten. Die prinzipiell-

le Funktionsfähigkeit des ATP/ADP-Austauschtests wiesen wir im Modellsystem



nach.

Die in diesem Abschnitt geschilderten Versuche zeigen eindeutig, daß das isolierte Enzym die Aktivierung von DL-2-Aminoadipinsäure als Aminoacyl-Adenylat katalysiert, wobei die Adenosin-5'-Phosphat-Komponente mit der 6-Carboxylgruppe der Amino adipinsäure verbunden ist. Die Aktivierung der Aminosäure an der 1-Carboxylgruppe ist aus folgenden Gründen auszuschließen:

- 1) Wegen der unterschiedlichen Dissoziationskonstanten der 1- und 6-Carboxylgruppe ist die elektrophoretische Beweglichkeit des Amino adipyl-1-hydroxamats deutlich verschieden von der des Amino adipyl-6-hydroxamats (s. dazu auch Experimente von Arnstein und Morris (29), die unter gleichen Bedingungen 1-(Glu)-Cys und 5-(Glu)-Cys elektrophoretisch eindeutig unterscheiden konnten)*. Wie oben schon beschrieben, identifizierten wir das enzymatisch ge-

* Eigene Experimente bestätigten die unterschiedliche Beweglichkeit während der Elektrophorese von 1-(AAA)Cys und 6-(AAA)Cys. Wir fanden folgende relative Beweglichkeiten: 6-(AAA)Cys = 1,0; 1-(AAA)Cys = 0,41; AAA = 0,47; Cys = -0,10. Die Elektrophorese wurde bei pH 4,5 mit 55 V/cm für 1,5 h durchgeführt. 1-(AAA)Cys erhielten wir von Fräulein Baier (s.S. 100) 6-(AAA)Cys wurde synthetisiert wie auf S. 102 beschrieben.

bildete Aminoadipyl-Hydroxamat durch Vergleich mit authentischer Substanz als Aminoadipyl-6-Hydroxamat.

- 2) Das Enzym katalysiert nicht die Aktivierung von Homoglutamin (2-Aminoadipinsäure-6-amid) als Adenylat (s.S. 37), die 1-Carboxylgruppe wird also nicht aktiviert. Dies ist jedoch kein strenger Beweis für die ausschließliche Aktivierung der 6-Carboxylgruppe, denn möglicherweise verhindert die Amid-Funktion die Bindung von Homoglutamin an das Enzym.

5. UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGISCHEN FUNKTION DES ENZYMS

5.1. Tripeptid-Synthese

Die gemeinsame Anreicherung von Amino adipinsäure-, Cystein- und Valin-aktivierendem Protein bis einschließlich der Chromatographie an DEAE-Sepharose-CL-6B (s.S. 16) veranlaßte uns, die Fähigkeit einer DEAE-Proteinpräparation zur Synthese von Amino adipylcysteinylvalin zu überprüfen. Als Vergleichssubstanz mußte zunächst authentisches Tripeptid synthetisiert werden. Die Synthese folgte einer Vorschrift von Fawcett et al. (30); sie ist im experimentellen Teil beschrieben (s.S. 90).

Tabelle 2 enthält eine Zusammenstellung der verschiedenen Inkubationen, die durchgeführt wurden, um die Bildung von Amino adipylcysteinylvalin (ACV) nachzuweisen. In Vorversuchen fanden wir eine radioaktive Substanz, welche gleiches elektrophoretisches Verhalten zeigte wie ACV. Die Menge an synthetischem ACV, die uns für diese Vorversuche zur Verfügung stand, reichte jedoch nicht aus, um alle Kontrollen und Enzymabhängigkeiten der ACV-Bildung durchzuführen.

Spätere intensivere Untersuchungen zeigten dann eindeutig, daß die Enzympräparation die Synthese von ACV nicht zu katalysieren vermag. Unter allen in Tabelle 2 zusammengestellten Bedingungen konnten wir niemals Einbau von Radioaktivität aus ¹⁴C-Amino adipinsäure in ACV nachweisen. Die in den Vorversuchen gefundene radioaktive Substanz mit gleichem elektrophore-

Tabelle 2: Inkubation zum Nachweis der enzymatischen Synthese von Amino adipylcysteinylvalin

Die Inkubationen enthielten in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml Substrate und Co-Faktoren wie in der Tabelle angegeben, sowie 0,5 bis 10 mg Protein der DEAE-Chromatographie. Nach 5 min bis 3 h bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl kalter HClO₄ (15 % v/v) oder durch Erhitzen auf 100°C (5min) abgestoppt und weiterverarbeitet, wie auf Seite 100 beschrieben. Kontrollinkubationen enthielten entweder kein ATP oder kein Enzym.

Die Inkubationen wurden außerdem durchgeführt mit Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 und 8,0, mit TEA-Puffer gleicher Zusammensetzung und unter Zusatz von 2 mM CoASH.

	ATP	MgCl ₂	1- ¹⁴ C-AAA ⁺	Cys	KPO ₄	PPase	DTT
	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM, pH 7)	(U)	(mM)
1	3.000	10	2.00 (2 µCi)	5	40	5	1
2	0.300	10	2.00 (2 µCi)	5	40	5	1
3	0.030	10	2.00 (2 µCi)	5	40	5	1
4	0.002	10	2.00 (2 µCi)	5	40	5	1
5	3.000	10	0.03 (2 µCi)	5	40	5	1
6	0.300	10	0.03 (2 µCi)	5	40	5	1
7	0.030	10	0.03 (2 µCi)	5	40	5	1
8	0.002	10	0.03 (2 µCi)	5	40	5	1

+ In ¹⁴C-AAA enthaltene radioaktive Verunreinigungen (3-4 %) wurden abgetrennt (s.S 89). Die radiochemisch reine AAA wurde für die Versuche verwendet.

tischem Verhalten wie ACV war möglicherweise eine Verunreinigung von ^{14}C -Aminoadipinsäure. Die Überprüfung dieser Annahme war allerdings nicht möglich, da wir keine radioaktive Aminoadipinsäure derselben Charge mehr zur Verfügung hatten.

Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden mit Enzympräparationen aus Mycel von drei verschiedenen Züchtungen durchgeführt. Bei allen drei Züchtungen hatten wir eine normale Penicillin-Produktion (1300 - 1900 I.E./ml zum Zeitpunkt der Ernte) gemessen. Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß das Cystein- und Valin-aktivierende Protein der Enzympräparation nicht an der Biosynthese von ACV beteiligt ist. Man muß vielmehr annehmen, daß es sich um Enzyme der Protein-Biosynthese handelt. Zwar konnten wir nach Inkubation des Proteins mit Hefe-tRNA und ^{14}C -Cystein bzw. ^{14}C -Valin mit Hilfe des Filtertestes nach Muench und Berg (31) keine Aminoacyl-tRNA-Bildung nachweisen, doch besteht die Möglichkeit, daß Hefe-tRNA für Aminoacyl-tRNA-Ligasen aus *Penicillium chrysogenum* kein Substrat darstellt. Weiterhin ist es denkbar, daß die Geschwindigkeit der Aminoacyl-tRNA-Bildung zu gering war, um mit dieser Methode nachgewiesen werden zu können.

5.2. Dipeptid-Synthese

Wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, konnte Bauer (12) die Synthese von Aminoadipylcysteinylvalin aus den konstituierenden Aminosäuren in zellfreien Extrakten von *Penicillium chrysogenum* zeigen. Die Umsatzraten waren jedoch extrem niedrig. Von 140 nMol ^{14}C -Valin wurden in 45 min nur 0,5 nMol in das Tripeptid eingebaut. Dies entspricht einer Syntheserate

von 0,25 nMol pro Stunde und 10 g feuchtem Mycel.

Loder und Abraham (13) beschrieben die Bildung von Amino adipylcysteinylvalin aus dem Dipeptid Amino adipylcystein und ^{14}C -Valin, nicht jedoch aus den einzelnen Aminosäuren bzw. aus Amino adipinsäure und Cysteinyl-Valin in Rohextrakten von *Cephalosporium acremonium* mit einer Syntheserate von 150 nMol pro Stunde und 10 g feuchtem Mycel. Sie lokalisierten diese "Tripeptid-Synthetase" in der Partikelfraktion des Extraktes nach Zentrifugation. Diese Proteinpräparation war jedoch nicht in der Lage, die Synthese von ACV aus den einzelnen Aminosäuren zu katalysieren. Ebenso wenig war die Bildung von Tripeptid aus Amino adipylcystein und Valin bzw. aus den konstituierenden Aminosäuren im zellfreien Überstand nachzuweisen. Legt man die von Bauer ermittelte Syntheserate zugrunde, so ist es allerdings fraglich, ob Loder und Abraham unter den beschriebenen Bedingungen einen so kleinen Einbau von Radioaktivität in ACV hätten nachweisen können. Die Tatsache, daß die "Tripeptid-Synthetase" in der Partikelfraktion des Rohextraktes gefunden wurde, muß nicht im Widerspruch stehen zu Bauers Arbeiten. Die Autoren wählten nämlich zum Aufschließen des Mycels eine Ultraschall-Behandlung, die bei Organismen wie *Penicillium chrysogenum* oder *Cephalosporium acremonium* mit ihren extrem harten Zellwänden bei weitem nicht so effektiv ist, wie etwa das Homogenisieren oder Verreiben des Mycels mit Glasperlen. Die letztere Methode wurde von Bauer angewendet.

Aus den hier beschriebenen Arbeiten kann man folgern, daß während der Biosynthese des Penicillins zunächst L-2-Aminoadipinsäure und L-Cystein zum Dipeptid Aminoadipylcystein verknüpft werden. Dieses Dipeptid reagiert schließlich nach Aktivierung der Carboxylgruppe des Cysteins unter Katalyse einer "Tripeptidsynthetase" mit Valin zu Aminoadipylcysteinyloxy-Valin.

Wir untersuchten daher die katalytische Aktivität des gereinigten Enzyms für die Bildung von Aminoadipylcystein (AC). Die chemische Synthese von AC als authentische Vergleichssubstanz ist auf S.102 beschrieben.

Tabelle 3 enthält die Bedingungen, unter denen die Inkubationen zum Nachweis der Synthese von Aminoadipylcystein durchgeführt wurden. Obwohl die Bildung von nur 3 pMol Dipeptid hätte nachgewiesen werden können, beobachteten wir keine Synthese von Aminoadipylcystein.

5.3. Aminoadipyl-6-semialdehyd-Bildung

Aus dem in der Einleitung (s.S. 4) Gesagten ergab sich die Möglichkeit, daß das Enzym ein Teil der schon von Sagisaka und Shimura (15) beschriebenen "Aminoadipinsäure-Reduktase" ist. Obwohl die Existenz von drei verschiedenen Enzymen (vergl. S. 5) für die Bildung von Aminoadipinsäure-6-semialdehyd aus Aminoadipinsäure, ATP und NADPH nachgewiesen ist (16), schien es uns nicht unmöglich zu sein, daß das hier beschriebene Enzym einen lockeren Komplex dieser drei Teilmolekularaktivitäten darstellt. Versuche, die Bildung von DL-2-Amino-

Tabelle 3: Inkubationen zum Nachweis der enzymatischen
Synthese von Amino adipylcystein

Die Inkubationen enthielten in 1,2 ml Gesamtvolumen Substrate und Co-Faktoren wie in der Tabelle angegeben, sowie 0,5 bis 3 mg AAA-AMP-Ligase. Nach 5-60 min bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl kalter HClO₄ (15 % v/v) abgestoppt und weiter verarbeitet, wie auf Seite 103 beschrieben.

Kontrollinkubationen enthielten entweder kein ATP oder kein Enzym.

	ATP (mM)	MgCl ₂ (mM)	1- ¹⁴ C-DL-AAA (µM*)	Cys (mM)	VAL (mM)	KPO ₄ (pH7, mM)	ANORGAN. PPASE (U)
1	3	10	2 (2 µC:)	5	5	40	5
2	3	10	0.03 (2 µC:)	5	5	40	5
3	0.3	10	2 (2 µC:)	5	5	40	5
4	0.3	10	0.03 (2 µC:)	5	5	40	5
5	0.03	10	2 (2 µC:)	5	5	40	5
6	0.03	10	0.03 (2 µC:)	5	5	40	5
7	0.002	10	2 (2 µC:)	5	5	40	5
8	0.002	10	0.03 (2 µC:)	5	5	40	5

* s. Fußnote zu Tabelle 2.

adipinsäure-6-semialdehyd nachzuweisen, schlugen allerdings fehl (s.S. 104). Ein Amino adipinsäure abhängiger NADPH-Verbrauch konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Allerdings war bei dieser Versuchsreihe die Nachweisempfindlichkeit möglicherweise zu niedrig.

Ein weiterer Punkt spricht gegen die Hypothese, das Enzym sei ein Komplex der drei Teilaktivitäten der "Aminoadipinsäure-Reduktase". Würde tatsächlich die Bildung von DL-2-Amino-adipinsäure-6-Semialdehyd aus Aminoadipinsäure, ATP und NADPH vom Enzym katalysiert, so wäre eine Hemmung der Aktivität im ATP/PP_i-Austauschtest durch NADPH zu erwarten, da enzymgebundenes Aminoacyl-Adenylat durch Reduktion und Spaltung nicht mehr für die Rückreaktion in Gleichung 1 zur Verfügung stünde. Eine solche Hemmung konnte aber selbst bei NADPH-Konzentrationen von 10 mM nicht beobachtet werden (Abb. 41).

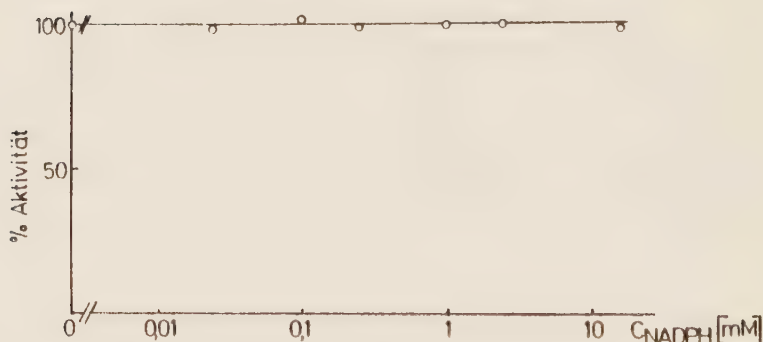


Abb. 41: NADPH im Standardtest

Zur Inkubationsmischung wurde NADPH in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Ansonsten wurde der Test wie üblich durchgeführt (s.S. 82).

5.4. Versuche zur Isolierung eines Enzym-AMP-AAA-Komplexes

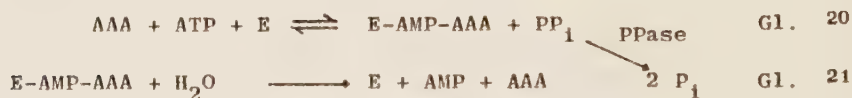
Lipmann et al. (32) beschrieben die Bildung eines Komplexes aus Gramicidin S-Synthetase und Aminoacyl-adenylaten. Bei Inkubation von Enzym mit den Gramicidin S bildenden Aminosäuren und ATP konnten sie die Bindung von 2 Mol Aminosäure pro Mol Enzym nachweisen:



Die Hälfte der proteingebundenen Radioaktivität liegt nicht kovalent gebunden als Aminoacyl-adenylat vor, die andere Hälfte ist als Thioester gebunden. Um Aufschluß über die Reaktion der AAA-AMP-Ligase mit Amino adipinsäure zu erhalten, führten wir analoge Experimente durch. Nach Inkubation des gereinigten Enzyms mit ^{14}C -Amino adipinsäure und ATP (s.S. 105) war jedoch unter verschiedensten Bedingungen weder kovalente noch nicht kovalente Bindung von Radioaktivität an Protein nachzuweisen. Auch der Zusatz von anorganischer Pyrophosphatase zur Inkubation, um die Rückreaktion nach Gl. 19 zu verhindern, hatte keinen Einfluß auf das Ergebnis.

Ähnliche Effekte sind auch bei verschiedenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen beschrieben (33). Diese Enzyme sollten in Abwesenheit von tRNA ebenso wie z.B. Gramicidin S-Synthetase Aminosäure als Adenylat gebunden tragen. Der Befund wird damit erklärt, daß gebundenes Aminoacyl-adenylat in Abwesenheit von Pyrophosphat sehr schnell vom Enzym abdissoziiert und in Lösung hydrolysiert. Bei Anwesenheit von Pyrophosphat könnte andererseits die Geschwindigkeit der Rückreaktion so groß werden, daß proteingebundene Radioaktivität nicht isoliert werden kann.

Erstere Hypothese trifft für die AAA-AMP-Ligase sicher nicht zu. Ein schnelles Abdissozieren des Aminoacylpyridadenylates vom Enzym und anschließende Hydrolyse der aktivierten Aminosäure in Abwesenheit von Pyrophosphat würde bedeuten, daß in Anwesenheit von anorganischer Pyrophosphatase eine schnelle ATP-Spaltung nach Gl. 20 und 21 abläuft.



Die Geschwindigkeit der ATP-Spaltung in unserem System (s. S. 45) war jedoch außerordentlich klein. Ohne Zusatz von CoASH als Akzeptor für die aktivierte Aminoacylpinsäure fanden wir Werte von ca. 2 pMol ATP-Spaltung pro Minute und mg Protein gegenüber einer ^{32}P -ATP-Bildungsrate von 125 nMol pro Minute und mg Protein im ATP/PP₁-Austauschtest.

Möglicherweise wird der in Anwesenheit der Substrate stabile Enzym-Aminoacylpinsäure-AMP-Komplex sehr labil, wenn die Substrate zur Isolierung des Komplexes durch Filtration über Sephadex G 50 abgetrennt werden. Eine solche Labilisierung des Komplexes könnte man zurückführen auf Konformationsänderungen der AAA-AMP-Ligase, bedingt durch die Anwesenheit von Substrat(en).

6. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Aus *Penicillium chrysogenum* konnte ein Enzym isoliert werden, welches die reversible Aktivierung von DL-2-Aminoadipinsäure als Adenylat katalysiert. Das Molekulargewicht des Proteins wurde bestimmt zu 176 000 bis 220 000 Dalton. Auf der SDS-Polyacrylamid-Diskelektrophorese ist nur eine Hauptproteinbande mit dem Molekulargewicht 70 000 Dalton zu erkennen; diese Bande enthält etwa 90 % der Gesamtproteinmenge.

Das Enzym katalysiert einen streng DL-2-Aminoadipinsäure-abhängigen ATP/PP₁-Austausch; es ist spezifisch für DL-2-Aminoadipinsäure, ATP und PP₁ als Substrate. Die spezifische Aktivität im Austauschtest liegt - je nach Enzympräparation - zwischen 70 und 125 mU/mg.

Versuche, die Bildung von Aminoadipylcystein, Aminoadipylcysteinylvalin und Aminoadipinsäure-6-semialdehyd nachzuweisen, schlugen fehl. Nach unserem derzeitigen Wissensstand handelt es sich um ein ausschließlich aktivierendes Enzym.

Nachdem ein Aminoadipinsäure-abhängiger ATP/¹⁴C-ADP-Austausch sowohl vom gereinigten Enzym, als auch von Rohextrakten aus *Penicillium chrysogenum* nicht katalysiert wird, muß man annehmen, daß die Aminoadipinsäure für die Biosynthese von Aminoadipylcysteinylvalin als Adenylat aktiviert wird. Das hier beschriebene Enzym könnte also an der Biosynthese von Penicillin, aber auch an der Biosynthese von Lysin beteiligt sein. Der Verzweigungspunkt der beiden Stoffwechselwege (s. Abb. 2) wäre dann nicht Aminoadipinsäure, sondern Aminoadipinsäureadenylat.

Die aktivierte Aminoadipinsäure würde im Falle der Lysin-Biosynthese mit NADPH zum Aminoadipinsäure-6-semialdehyd reduziert (Abb. 42).

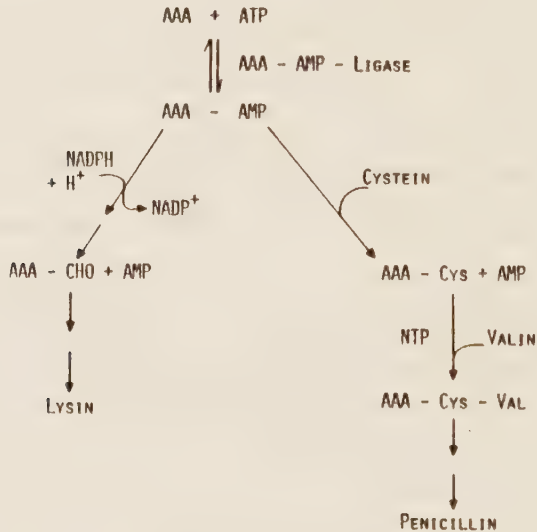


Abb. 42: Aminoadipyladenylat als Verzweigungspunkt der Lysin- und der Penicillin-Biosynthese in *Penicillium chrysogenum*

Bei der Biosynthese von Penicillin müßte Aminoadipinsäure-adenylat mit Cystein unter Katalyse einer "Dipeptidsynthetase" zu Aminoadipylcystein verknüpft werden. Das Dipeptid reagierte schließlich nach Aktivierung der Carboxylgruppe des Cysteins unter Katalyse der von Loder und Abraham beschriebenen "Tripeptidsynthetase" mit Valin zu Aminoadipylcysteinylvalin (Abb. 42).

7. EXPERIMENTELLER TEIL

7.1. Verwendete Geräte

Spektralphotometer Eppendorf mit Kompensationsschreiber G 6511,
Netheler und Hinz

Spektralphotometer PM 6, Zeiß, Oberkochen

Spektralphotometer Cary, Modell 14

Durchflußphotometer Isco, Modell UA 5

Durchflußphotometer Uvicord II, LKB, Uppsala

Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer 3385, Packard

Mark II Liquid Scintillation System, Nuclear Chicago Division,
Searle

Präparative Zentrifuge WKF, Modell G 50 K

Automatic Superspeed Centrifuge Sorvall, Modell RC 2 und RC 2 B

Präparative Ultrazentrifuge Beckmann Spinco, Modell L 3-50
und L 2-65 B

Analytische Ultrazentrifuge Beckmann Spinco, Modell E

Tischzentrifuge Christ, Junior 1

Tischzentrifuge Eppendorf, Modell 3200

Tischzentrifuge Hettich

Fraktionskollektoren und Schlauchpumpen der Fa. LKB

pH-Meter E500, Metrohm

Zellhomogenisator nach Merckenschlager, Schloßmann und Kurz (40)

Eigenbau, Moosbauer, Biochemisches Institut der Universität

München; Eigenbau, Werkstatt MPI für Biochemie, Martinsried

Hochdruck-Dampsterilisator, Euroclinic, Modell Pulsmatic

Gyrotory Shaker, New Brunswick, Modell G 53

Fermentor New Brunswick, Modell FS-413

Fermentor Bioengineering, Uster/Schweiz

Wäscheschleuder Fa. Miele

Gefriertrocknungs-Anlage, WKF, Modell L 05 und L 2

Omni-Mixer, Servall, Typ 17220

Elektrophorese-Apparatur, Eigenbau MPI für Biochemie,
Martinsried

Dünnschichtscanner Berthold, Modell LB 2722 und Dual Ratemeter
Integrator, Modell LB 242 K

Papierchromatogramm-Scanner Berthold, Modell LB 280 und Rate-
meter Integrator, Modell LB 241 K

Hochspannungs-Papierelektrophoresetanks LT 48 A, Savant

Hochspannungsgleichrichter, Hölzel

Säulenchromatographie-Zubehör, Serva

Hochdruck-Flüssigkeitschromatograph Constametric II mit
Gradient Master und Spectromonitor II, Latek

Speisegeräte Camag

Rotationsverdampfer Büchi

Trockenschrank Heraeus

Mikroliterspritzen Hamilton

Mikroliterpipetten und Reaktionsgefäße Eppendorf

Analysenwaagen Mettler H 54 und H 35

Magnetrührer Colora und IKA

Elektrofokussiersäule, LKB, Typ 8101, 110 ml

7.2. Materialien

Enzyme und Coenzyme waren, wenn nicht anders vermerkt, von Boehringer Mannheim, alle anderen Chemikalien, sofern nicht extra aufgeführt, waren von der Fa. Merck AG. Darmstadt. Sämtliche Radiochemikalien wurden von Amersham-Buchler, Braunschweig bezogen.

RSA: Behringwerke

Hydroxylapatit (Biogel HT) : BioRad Laboratories

Bactoagar: Difco Laboratories

Glasperlen: Dragonwerk, Georg Wild, Bayreuth

Dextranblau sowie die verschiedenen Sephadex- und Sepharose-Typen: Pharmacia

Dithiothreit: Calbiochem

Unisolve I: Koch-Light, Colnbrook-Buchs

Röntgenfilm x-o-mat: Kodak, Rochester

Entwickler Röntogen, Fixierer Superfix: Tetenal, Hamburg

Varsol: Esso-Münoco, München

PPO, DM-POPOP: Packard, Frankfurt

HPTLC-Dünnschichtplatten: Merck

Papier Whatman 3MM: Whatman

Haferflocken: Kölln, Elmshorn

Maisquellwasser: Geschenk der Fa. Hoechst AG und der Fa. Maizena

Sojaöl: Geschenk der Fa. Hoechst AG

Penicilinase: Koch-Light Laboratories

Ampholine: LKB

DL-2-AAA: Sigma

Norit A Aktivkohle: Serva

DCC: Geschenk von Prof. Moroder, MPI für Biochemie, Martinsried

Carbobenzoxychlorid, Hydroxybenztriazol, o-Aminobenzaldehyd,
S-Benzyl-L-Cysteinmethylester:Fluka

4-Methoxybenzylchlorid: Ferak

Azidoameisensäure-4-Methoxybenzalester (4-Methoxybenzyloxy-
carbonylazid): Ega-Chemie

7.3. Allgemeine Methoden

7.3.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Biuret-Methode (34)
oder, bei verdünnten Proteinlösungen, nach Warburg und
Christian (35).

7.3.2. Radioaktivitätsmessung

Radioaktivität wurde bestimmt durch

Mischen wässriger Lösungen mit 10 ml Unisolve I bzw.

Mischen organischer Lösungen mit 10 ml Toluol-

Scintillator (12 g PPO + 0,75 g Dimethyl-POPOP in 2,5 ltr.
Toluol);

Zählen radioaktiver Papierstreifen (3 x 8 cm) in Toluol-
Scintillator;

"Scannen" radioaktiver Papierstreifen mit einem Papier-
chromatogramm-Scanner;

Autoradiographie:

Das Chromatogramm wurde im Dunkeln auf einen Röntgenfilm
gepreßt. Die Belichtungszeit betrug je nach Höhe der
eingesetzten Radioaktivität 12 Std. bis 4 Tage. Durch
Markieren des Papiers mit radioaktiver Tinte an mehreren

Stellen konnten die geschwärzten Teile des Films eindeutig auf dem Chromatogramm lokalisiert werden.

7.3.3. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Es wurde das Gerät Constametric II mit Gradient Master und Spektromonitor II der Fa. Latek verwendet. Wir benützten eine RP-C 18 Reversed-Phase Säule (1 x 25 cm) mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 5-8 ml/min.

7.3.4. Dünnschicht-Chromatographie

Verwendete Laufmittel für die DC:

LM A n-Butanol/Eisessig/Wasser	10/2/3	v/v
LM B Chloroform/Methanol/Eisessig	90/5/5	v/v
LM C n-Butanol/Eisessig/Wasser	4/1/4	v/v Oberphase

Die Chromatographien wurden auf HPTLC-Fertigplatten (10 x 10 cm) der Fa. Merck durchgeführt.

Aminosäuren wurden durch Besprühen der Platten mit 0,2 % (w/v) Ninhydrin in Aceton und anschließendes Erhitzen auf 60°C für 15 min sichtbar gemacht.

N-substituierte Aminosäuren wurden vor der Behandlung mit Ninhydrin mit 70 % (v/v) TFA besprüht und 20 min auf 60°C erwärmt.

7.3.5. Hochspannungs-Papierelektrophorese

Die Substanz wurde auf Whatman 3 MM Papier (40 x 110 cm) aufgetragen. Nach Besprühen des Papiers mit Elektrophorese-Puffer wurde für 1-2 h in einem Elektrophoresetank nach Michl eine Spannung von 5000 V angelegt. Die Tanks enthielten Varsol als Kühlmittel. Das fertige Chromatogramm wurde bei 50°C getrocknet.

Verwendete Elektrophorese-Puffer:

20 % (v/v) Eisessig in H_2O , mit Ameisensäure auf pH 1,8 eingestellt;

Pyridin-Acetat-Puffer, 50 mM an Acetat, pH 4,5.

7.3.6. Perameisensäure-Oxydation

Die Oxydation wurde durchgeführt wie bei (36) beschrieben:

Die zu oxydierende Probe wurde mit PAS ($H_2O_2/H_2O/HCOOH = 1/1/8$, v/v) 6 h bei $0^\circ C$ inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit der 10-fachen Menge H_2O verdünnt und lyophilisiert.

7.4. Zu Kapitel 2

7.4.1. Stammhaltung und Aufzucht von *Penicillium chrysogenum*

Der Stamm* wurde durch Ausstreichen von Sporen auf einem Schrägagar angezüchtet. Nach drei bis vier Tagen bildete sich ein grau-grüner Sporenrasen aus. Zur Stammhaltung wurden alle vier bis fünf Wochen neue Schrägagars ausgestrichen.

Schrägröhrchen - Haferflockenagar:

5 g Haferflocken (Köln Schmelzflocken) wurden mit 1,5 g Agar im Mörser fein zerrieben und in 100 ml Leitungswasser 1 Std. gekocht. Je 10 ml des Breis wurden in Reagenzgläser abgefüllt und 30 min bei $120^\circ C$ sterilisiert.

* Der Stamm *Penicillium chrysogenum* CP 33 und die Züchtungsvorschrift wurden freundlicherweise von den Farbwerken Hoechst zur Verfügung gestellt. Wir danken der Fa. Hoechst, insbesondere Herrn Dr. Neumann sehr herzlich für eine mehrtägige Einweisung in die Penicillin-Fermentation.

Sporensuspension:

Ein Schrägagar wurde mit 5 ml sterilem H_2O dest. (enthält 1 % Tween 80) geschüttelt. Die Suspension enthält ca. 5×10^7 Sporen/ml.

Vorkultur:

Das Medium für die Vorkultur enthält pro Liter:

20 g Saccharose, 40 g Maisquellwasser, 10 $CaCO_3$, 0,5 g N-2-Hydroxyäthyl-Phenylacetamid, 10 g Sojaöl.

Je 680 ml des Mediums wurden in 2 ltr. Fernbachkolben abgefüllt und 20 min bei $120^\circ C$ sterilisiert. Nach Beimpfen der Kultur mit 3 ml der Sporensuspension wurde 48 Stdn. bei $26^\circ C$ und 250 Upm auf einem "Rotary-Shaker" geschüttelt.

Zwischenkultur:

Das Medium für die Zwischenkultur enthält pro Liter:

46 g Lactose, 40 g Maisquellwasser, 10 g $CaCO_3$, 2,5 g N-2-Hydroxyäthyl-Phenylacetamid, 7 g KH_2PO_4 , 3 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$.

Je 10 ltr. dieses Mediums wurden in einem 14 ltr. Fermentor sterilisiert (30 min bei $120^\circ C$), mit 2 Kolben der Vorkultur angeimpft und 48 h bei $26^\circ C$ unter Rühren mit 250 Upm und Belüften (10-13 ltr/min) fermentiert.

Hauptkultur:

180 ltr steriles Medium (Zusammensetzung wie in der Zwischenkultur) wurden mit 40 ltr der Zwischenkultur beimpft, bei $26^\circ C$ und Belüften mit 800 ltr Luft pro min mit 250 Upm gerührt und nach 76 h über eine Filterpresse* geerntet. Das feuchte Mycel

* Wir danken Herrn Dr. Brunner, Fa. Boehringer Mannheim, Tutzing, für die Durchführung der Filtration.

wurde eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

Wurden nur kleinere Mengen Nycel benötigt, so wurde die Zwischenkultur nach 76 h in Leinensäcke geerntet, in einer Wäscheschleuder zentrifugiert, 3 x mit kaltem H_2O gewaschen und lyophilisiert.

Darstellung von N-2Hydroxyäthyl-Phenylacetamid:

Die Synthese des "Seitenketten-Precursors" für Benzyl-Penicillin erfolgte im Wesentlichen nach einer Vorschrift von Behrens et al. (37). 3,28 kg (20 Mol) Phenylelessigsäure-Äthylester wurden mit 1,34 kg (22 Mol) Äthanolamin 16 Std. am Rückfluß erhitzt. Das entstandene Äthanol wurde abdestilliert; das zurückgebliebene Öl erstarrte über Nacht bei 4°C . Die weiße feste Masse wurde aus ca. 10 ltr. Essigsäure-Äthylester umkristallisiert. Die weißen Kristalle wurden mit ca. 2 ltr. kaltem Essigsäure-Äthylester und mit ca. 2 ltr. Diäthyläther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Wir erhielten 1,9 kg (10,6 Mol) Produkt (53 % Ausbeute) mit Fp. $\approx 60,5 - 61,0^{\circ}\text{C}$ (entspricht dem Literaturwert).

Analytik zur Züchtung:

Das Verfolgen des Kulturwachstums mit Hilfe der Trockengewichtsbestimmung war nicht möglich, da das Medium große Mengen an nicht gelösten Bestandteilen (CaCO_3 und Substanzen im Maisquellwasser) enthielt, welche die Filtration und das Waschen des Mycels über eine Filtrernutsche unmöglich machten. Zur Bestimmung der herangewachsenen Mycelmenge wurde daher aus dem Fermentor ein Aliquot der Kultursuspension entnommen und durch

ein grobes Leintuch abgepreßt. Das leicht bräunliche Mycel wurde mit 3 g Glasperlen und 30 ml Puffer B im Zellhomogenisator nach Schlossmann geschüttelt. Nach 15 min Zentrifugation bei 30 000 g wurde der Proteingehalt des zellfreien Überstandes mit der Biuretmethode bestimmt.

Penicillin im Kulturmedium wurde im optischen Test nach Boxer und Everett (38) nachgewiesen. Der β -Lactamring des Antibiotikums reagiert mit Hydroxylamin unter Bildung der Hydroxamsäure. Diese liefert mit Fe-III-Chlorid einen purpurroten Komplex, welcher bei 546 nm ein Adsorptionsmaximum besitzt.

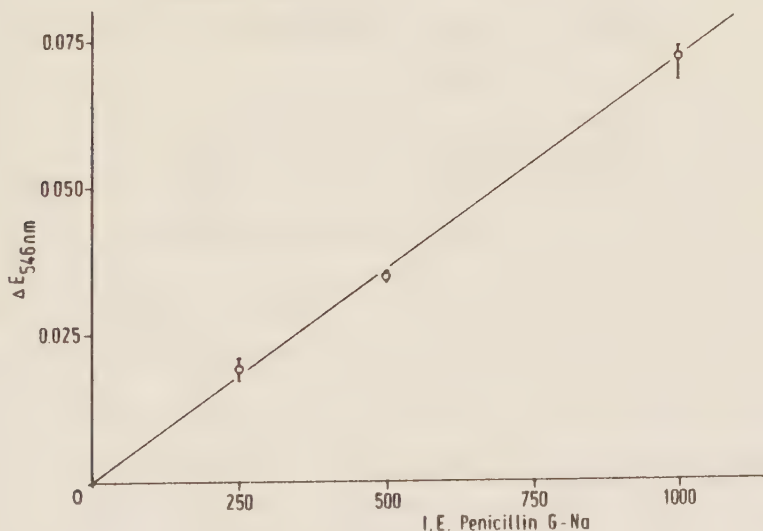


Abb. 43: Eichgerade zur Bestimmung von Penicillin im optischen Test nach Boxer und Everett (38)

Die Penicillin-Konzentration der Probe kann dann aus einer Eichgeraden entnommen werden. Im Bereich von 200-1000 I.E. ist die Adsorption der Testlösung direkt proportional der eingesetzten Penicillinmenge (Abb. 43).

Reagentien:

Lösung 1: 689,2 g NaOH + 34,2 g Natriumacetat x 3 H₂O wurden mit bidest. H₂O ad 1000 ml gelöst.

Lösung 2: 35 g NH₂OH x HCl wurden mit bidest. H₂O ad 100 ml gelöst.

Lösung 3: 12,5 ml Lösung 1 + 12,5 ml Lösung 2 + 37,5 ml bidest. H₂O + 12,5 ml Äthanol wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt und mit bidest. H₂O ad 250 ml aufgefüllt.

Lösung 4: 100 g NH₄Fe(SO₄)₂ wurden in 600 ml bidest. H₂O gelöst. Nach Zugabe von 140 g H₂SO₄ konz. wurde mit bidest. H₂O ad 1000 ml aufgefüllt.

Die aus dem Kulturmedium steril entnommene Probe wurde über Kieselgel im Vakuum filtriert. Der klare Durchlauf wurde zum Test eingesetzt.

Messung im Photometer bei 546 nm:

0,5 ml Probe wurden mit 5 ml Lösung 3 15 bis maximal 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Lösung 4 wurde nach 2,5 bis 3 min die Extinktion bei 546 nm abgelesen.

Zu jedem Wert wurde ein Blindwert gemessen: Die Probe wurde vor der Inkubation mit Lösung 3 15 min bei 25°C mit Penicillinase behandelt. Dieser Blindwert erfaßte also Substanzen, welche ähnlich wie Penicillin mit NH_2OH bzw. mit Fe-III-Chlorid reagieren. So wird der Test spezifisch für Penicillin.

7.4.2. Isolierung des Enzyms

Verwendete Puffergemische:

Puffer A: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM DTT, 10 % v/v
Glycerin, 30 % AS

Puffer B: 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM DTT, 10 % v/v
Glycerin

Puffer C: 300 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM DTT, 10 % v/v
Glycerin

Puffer D: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM DTT, 10 % v/v
Glycerin, 90 % AS

Alle Operationen wurden bei 0-4°C durchgeführt; die Aktivität des Enzyms wurde im AT/PP_1 -Austauschtest bestimmt (s.S 82).

7.4.2.1. Zellfreier Extrakt

Je 15 g lyophilisiertes Mycel wurden in 250 ml Puffer A suspendiert und mit 220 g Glasperlen 1,5 min bei 0-4°C in einem Zellhomogenisator nach Merckenschlager (39) aufgeschlossen. Das Homogenat aus sechs Aufschlüssen wurde 30 min im GSA-Rotor bei 20 000 g zentrifugiert. Der gelblich trübe Überstand mit einem Proteingehalt von ca. 6 mg/ml wurde über Glaswolle filtriert, um die obenauf schwimmende Fettschicht zu entfernen.

7.4.2.2. Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Der so gewonnene zellfreie Extrakt wurde mit festem Ammoniumsulfat bis 60 % der Sättigung versetzt. Die Zugabe des Ammoniumsulfats erfolgte während 40-45 min; der pH-Wert der Lösung wurde mit 0,1 N NH_4OH bei pH 7,0 gehalten. Die Suspension wurde weitere 30 min gerührt und schließlich 30 min im GSA-Rotor bei 20 000 g zentrifugiert. Der stark gelblich-braun gefärbte Niederschlag wurde in ca. 150 ml Puffer A aufgenommen; nicht gelöstes Material wurde durch Zentrifugation bei 60 000 Upm im 60 Ti-Rotor für 2 Std. entfernt.

7.4.2.3. Erste Chromatographie an DEAE-Sepharose-CL-6B

Der so erhaltene klare Überstand (ca. 120 ml, 20-25 mg/ml Protein) wurde nach Entsalzen und Umäquilibrieren über Sephadex G 50 (8 x 40 cm, äquilibriert mit Puffer B) auf eine DEAE-Sepharose-CL-6B-Säule (5x25 cm, äquilibriert mit Puffer B) gepumpt. Nicht bindendes Material wurde mit Puffer B eluiert und verworfen. Aktives Protein wurde mit einem Gradienten (2 x 1,5 ltr.) von 0-1 M NaCl in Puffer B eluiert. 27 ml - Fraktionen wurden aufgefangen. Die Fraktionen mit einer Leitfähigkeit von $1,3 - 3,1 \times 10^{-2}$ S wurden vereinigt und mit festem Ammoniumsulfat bis 70 % der Sättigung versetzt. Die Suspension wurde 30 min im GSA-Rotor bei 20 000 g zentrifugiert; der Niederschlag wurde in 40-50 ml Puffer B aufgenommen.

7.4.2.4. Chromatographie an Hydroxylapatit

Die so erhaltene klare Proteinlösung wurde über Sephadex G 50 (5 x 25 cm, äquilibriert mit Puffer B) entsalzt und auf eine

Hydroxylapaptit-Säule (5 x 25 cm, äquibriert mit Puffer B) aufgepumpt. Nicht adsorbierendes Material wurde mit Puffer B eluiert und verworfen. Aktives Protein wurde mit Puffer C eluiert, aufgefangen, mit Ammoniumsulfat bis 70 % der Sättigung versetzt und 30 min bei 30 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in maximal 4 ml Puffer B aufgenommen.

7.4.2.5. Gelfiltration an Sepharose-CL-6B

Die klare Proteinlösung aus dem vorhergehenden Schritt (300 - 400 mg Protein) wurde auf eine Sepharose-CL-6B-Säule (2,5 x 80 cm, äquibriert mit Puffer B) aufgesetzt und mit Puffer B eluiert. Hoch- und niedermolekulares Material wurde verworfen. Die aktives Enzym enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt.

7.4.2.6. Zweite Chromatographie an DEAE-Sepharose-CL-6B

Die klare Proteinlösung aus der Gelfiltration wurde auf eine DEAE-Sepharose-CL-6B-Säule (2,5 x 60 cm, äquibriert mit Puffer B) gepumpt. Nach Spülen mit 50 ml Puffer B wurde ein Gradient von 0-0,5 M NaCl in Puffer B (2 x 500 ml) angelegt. Das Säuleneluat wurde in Fraktionen von 8 ml aufgefangen. Aktives Protein enthaltende Fraktionen wurden vereinigt, bis 70 % der Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt und 30 min bei 30 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in ca. 2 ml Puffer D suspendiert und bei -15°C aufgehoben. Die Suspension hatte in der Regel einen Proteingehalt von ca. 30 mg/ml.

7.5. Zu Kapitel 3

7.5.1. Gelfiltration an Sephadex G-200

Die Gelpermeations-Chromatographie zur Bestimmung des Molekulargewichtes des Enzyms wurde auf einer Sephadex G-200-Säule (1,5 x 145 cm) durchgeführt. Die Säule war äquilibrirt mit Puffer B; 250 μ l Protein (ca. 3 mg) wurden aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 0,12 ml/min.

Fractionen à 1,2 ml wurden aufgefangen. Das Eluat wurde bei 280 nm vermessen. Als Eichproteine wurden verwendet: Katalase (20 mg), Aldolase (11 mg), Ferritin (2 mg) und Cytochrom c (6 mg) in 250 μ l Puffer B.

7.5.2. Analytische Ultrazentrifugation

Es wurde eine analytische Ultrazentrifuge vom Typ Spinco Modell E mit Scanner Optik und dem Rotortyp AND 3010 verwendet. Enzym und Katalase lagen in Puffer B vor (je 6,5 mg Protein pro ml). Die Zentrifugation wurde bei 1-2°C und 59760 Upm durchgeführt. Katalase als interner Standard lief in einer "wedge-Zelle" mit.

7.5.3. Zentrifugation im Rohrzucker-Dichtegradienten

Die Zentrifugation wurde im Rotor SW 41 durchgeführt. Der lineare Gradient (5-25 % w/v an Saccharose) war 20 mM an Kaliumphosphat, pH 7,0 und 1 mM an DTT. Pro Becher wurden 1,5 mg Protein aufgesetzt. Es wurde 18 Stdn. bei 41 000 Upm und 3°C zentrifugiert. Die Gradienten wurden von unten fraktioniert (0,6 ml/Fraktion).

7.5.4. Isoelektrische Fokussierung

In einer 110 ml Elektrofokussier-Säule von LKB wurde folgender Gradient aufgeschichtet:

Schwerer Teil: 2,8 ml Ampholine 40 % pH 3,5 bis 10,0
 28 g Saccharose
 9 mg DTT
 1 ml Enzym (6 mg, gelöst in Puffer B,
 AS-frei)
 ad 60 ml H₂O dest.

Leichter Teil: 0,95 ml Ampholine wie oben
 3 g Saccharose
 ad 60 ml H₂O dest.

Es wurde unter Kühlung auf 4°C 16 Stdn. lang fokussiert. Während der ersten Stunde wurde mit 250 Volt und 4 mA fokussiert, dann wurde das System auf eine konstante Leistung von 2 W stabilisiert. Nach Beendigung des Laufes wurde der Gradient in Fraktionen à 1 ml aufgefangen; die einzelnen Fraktionen wurden bei 280 nm vermessen und auf Aktivität getestet.

7.5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Die Elektrophoresen wurden in Plattengelen durchgeführt. Das Obergel hatte eine Polyacrylamid-Konzentration von 3,0 %, das Trenngel war ein Gradient mit Polyacrylamid-Konzentrationen von 5-25 %. Die folgenden Angaben entsprechen weitgehend denen von Lämmlí (40).

Gradientengel:

5 % - Lösung	5 % Acrylamid, 0,13 % Methylen-Bisacrylamid, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,33 % SDS, 0,01 % TEMED, 0,25 mg/ml Per
25 % - Lösung	25 % Acrylamid, 0,4 % Bis, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,08 % SDS, 0,01 % TEMED, 0,25 mg/ml Per.
Obergel	3 % Acrylamid, 0,08 % Bis, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,025 % TEMED, 0,6 mg/ml Per.

Spaltpuffer:

1,95 ml Tris-HCl, 1 M, pH 6,8, 0,9 g SDS, 1,5 ml Mercaptoäthanol,
3 ml Glycerin, 300 μ l 0,1 % w/v Bromphenolblau in 10 ml H₂O
bidest. Alle %-Angaben sind in w/v!

Die Proben wurden mit dem doppelten Volumen Spaltpuffer 15 min
bei 90°C inkubiert, abgekühlt und auf die Platten aufgetragen.
Die Elektrophoresen wurden bei 4°C und 200-300 V durchgeführt.
Nach Ende des Laufes wurde das Gel eine Stunde bei 50°C in
einer Färbelösung (1,25 g Coomassie G 250, 454 ml 50 % v/v
Methanol, 46 ml Eisessig) angefärbt und anschließend mit Ent-
färberlösung (7,5 % v/v Eisessig, 10 % v/v Methanol) entfärbt.

7.6. Zu Kapitel 4

7.6.1. Bestimmung der Aktivität des Enzyms im ATP/PP₁-Aus- tausch-Test:

Standardtest; (abgeändert nach Calendar und Berg (41)).

Die Inkubation enthielt in einem Gesamtvolumen von 110 μ l:

ATP (0,33 μ Mol), MgCl₂ (1,76 μ Mol), DL-2-AAA (0,55 μ Mol) bzw.

L-Cystein (0,3 μ Mol) bzw. L-Valin (0,3 μ Mol), Na₄P₂O₇ (0,39 μ Mol),

$\text{Na}_4^{32}\text{P}_2\text{O}_7$ (0,1-0,5 μCi), DTT (0,20 μMol), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,0, 4,4 μMol), SA (0,11 mg) und Enzym (5-150 μg). Kontrollinkubationen enthielten keine AAA.

Die Inkubationen wurden - wenn nicht anders vermerkt - nach 15 min bei 25°C mit 100 μl 15 % v/v HClO_4 (0,4 M an $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) versetzt; durch Zugabe von 20 μl einer 15 %-igen w/v wässrigen Aktivkohle-Suspension wurde das ATP gebunden. Freies $\text{Na}_4^{32}\text{P}_2\text{O}_7$ wurde durch Waschen der Kohle (5 x mit je 700 μl H_2O dest.) vollständig entfernt. Die in ATP eingebaute Radioaktivität wurde durch Hydrolyse mit 700 μl 1 N HCl (60 min bei 100°C) freigesetzt. Nach Zentrifugation wurden 500 μl vom Überstand mit 10 ml Unisolve versetzt und im Scintillationszähler gemessen. Unter diesen Bedingungen war die ^{32}P -ATP-Bildung bis etwa 40 min linear und direkt proportional der eingesetzten Enzymmenge (s. Abb. 5,6).

7.6.2. Abhängigkeit der ^{32}P -ATP-Bildung von der Inkubationsdauer

Die Inkubation enthielt in einem Gesamtvolumen von 2,24 ml: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (90 μMol , pH 7,0), ATP (6,7 μMol), DTT (4,0 μMol), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (8,0 μMol , 10 μCi), DL-2AAA (11 μMol), MgCl_2 (35 μMol), SA (2,24 mg), Enzym (1 mg).

Die Kontrollinkubation enthielt keine AAA.

Nach verschiedenen Zeiten wurden 100 μl Aliquote der Inkubation entnommen, mit 100 μl HClO_4 15 % v/v versetzt und weiter verarbeitet, wie unter 7.6.1. beschrieben.

7.6.3. γ -³²P-ATP-Spaltungstest

Die Inkubation enthielt in einem Gesamtvolumen von 110 μ l: Triäthanolamin-Puffer (4,4 μ Mol, pH 7,0), γ -³²P-ATP (50 pMol, 0,5 μ Ci), DL-2-AAA (0,55 μ Mol), DTT (0,22 μ Mol), CoASH (0,33 μ Mol), MgCl₂ (1,76 μ Mol), SA (0,11 mg), anorg. Pyrophosphatase (2 U), Enzym (5-150 μ g).

Nach in der Regel 15 minütiger Inkubation bei 25°C wurden 100 μ l eiskalte HClO₄ 15 % v/v (0,4 M an Kaliumphosphat) und 20 μ l Aktivkohle-Suspension (15 % w/v) zugegeben. Nach Zentrifugation wurden 150 μ l des Überstandes mit 5 ml Unisolve I versetzt und im Scintillationszähler gemessen. Kontrollen enthielten entweder keine AAA oder kein Enzym. Käufliches γ -³²P-ATP enthielt stets 1-5 % radioaktive Verunreinigungen, die nicht an Aktivkohle adsorbierten und somit den Test erheblich störten. Das Substrat wurde daher durch Behandlung mit Aktivkohle gereinigt: γ -³²P-ATP (100 μ l, ca. 50-100 μ Ci) wurden bei 4°C mit 100 μ l HClO₄ (5 % v/v) und 20 μ l Aktivkohle (15 % w/v) geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag wurde 4 x mit je 700 μ l eiskaltem H₂O gewaschen. Das gereinigte γ -³²P-ATP wurde durch Behandlung mit 5 % v/v wässrigem Pyridin (3 x 500 μ l) von der Aktivkohle eluiert. Die vereinigten Eluate wurden bei -10°C über Nacht lyophilisiert. So gereinigtes γ -³²P-ATP war zu 99,9 % rein (gemessen an der Radioaktivität im Überstand nach Behandeln mit Aktivkohle), enthielt jedoch nach einer Woche bei -60°C schon wieder 4-5 % radioaktive Substanzen, die nicht an Aktivkohle adsorbierten. Für sämtliche Versuche mit γ -³²P-ATP wurde daher nur frisch gereinigte Substanz verwendet.

7.6.4. Zeitabhängigkeit der γ - ^{32}P -ATP-Spaltung

Die Inkubation enthielt in einem Gesamtvolumen von 2,24 ml: Triäthanolamin-Puffer (90 μMol , pH 7,0), DTT (4 μMol), CoASH (4,4 μMol), γ - ^{32}P -ATP (1 nMol, 10 μCi), MgCl_2 (35 μMol), SA (2,2 mg), anorganische Pyrophosphatase (40 U), DL-2-AAA (11 μMol), Enzym (1,4 mg). Nach verschiedenen Zeiten wurden aus der Inkubation 100 μl Aliquote entnommen, mit 100 μl eiskalter HClO_4 (15 % v/v, 0,4 M an Kaliumphosphat) versetzt und weiterverarbeitet, wie unter 7.6.3. beschrieben. Kontrollinkubationen enthielten keine AAA bzw. kein Enzym.

Zur Identifizierung der Reaktionsprodukte wurde eine Inkubation wie unter 7.6.3 beschrieben, aber ohne Zusatz von Pyrophosphatase durchgeführt. Der Überstand nach Aktivkohle-Behandlung wurde mit ATP (0,3 μMol), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (0,3 μMol), und Na_3PO_4 (0,3 μMol) versetzt und auf Whatman 1 MM-Papier aufgetragen. Durch absteigende Chromatographie für 20 Stdn. im Laufmittel n-Butanol/n-Propanol/Aceton/Ameisensäure (80 % w/v)/Trichlor-essigsäure (30 % w/v) wie 40/20/25/25/15 v/v (100 ml Laufmittel enthielten 50 mg EDTA-Na_4) (42) wurden die drei Substanzen klar voneinander getrennt. Wir erhielten folgende R-Werte relativ zu Orthophosphat: ATP = 0,12, Pyrophosphat = 0,52, Orthophosphat = 1,00. ATP wurde durch Beleuchten des Papiers mit UV-Licht lokalisiert, Phosphat ergab nach Besprühen des Chromatogramms mit Ammonium-Molybdat (1 % w/v in H_2O) und SnCl_2 (1% w/v in H_2O) blaue Flecken. Die Flecken wurden ausgeschnitten und in Scintillator gezählt.

7.6.5. DL-2-Aminoadipyl-6-Hydroxamat-Bildung

7.6.5.1. Synthese von DL-2-AAA-6-NHOH

Vorbemerkung:

Hydroxamsäure wurde quantitativ durch Messen der Absorption des Fe-III-Komplexes bestimmt (28). 1 ml Probe wurden mit 1,5 ml Fe-III-Reagenz (0,37 M FeCl_3 , 0,2 M TCA, 0,67 M HCl) versetzt. Die Extinktion der Mischung wurde bei 535 nm im Photometer gemessen. Der Extinktionskoeffizient für AAA-NHOH beträgt $0,93 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$, die Adsorption bei 535 nm ist der eingesetzten Menge an Hydroxamat direkt proportional im Bereich von $\text{OD}_{535} = 0,05$ bis 1,5. Das als Zwischenprodukt gebildete AAA-Adenylat wurde durch Behandeln mit zweifach destilliertem Hydroxylamin (2 M, pH 6,5 mit KOH; 0,5 ml Adenylat + 0,5 ml NH_2OH , 5 min bei Raumtemperatur) in das Hydroxamat übergeführt und gemessen wie oben beschrieben. Auf Papier wurde das Hydroxamat durch Besprühen mit dem Fe-III-Reagenz als rötlicher Fleck sichtbar.

11,2 g MOZ-DL-2-AAA-1-(4-MB-Ester) (DCHA-Salz, 18 mmol, Synthese s. S. 95) in 500 ml 0,2 M Na_2HPO_4 (pH 3,0 mit 0,1 M Citronensäure) wurde 3 x mit je 500 ml Diäthyläther und 2 x mit je 500 ml CHCl_3 geschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockne gebracht. Der weiße Rückstand wurde in 200 ml wässrigem Pyridin (75 % v/v) gelöst und auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 9 g AMP (18 mmol) wurden 72 g DCC (35 mmol) in 72 ml Pyridin

zugetropft. Die klare Lösung wurde 2 Stdn. bei 0°C gerührt. Ausgefallenes Material wurde in der Kälte abfiltriert; der Rückstand wurde mit 30 ml kaltem Pyridin gewaschen. Das Filtrat wurde mit 1,5 ltr. Aceton bei -15°C versetzt; der weiße Niederschlag wurde abgenutscht und an der Ölpumpe getrocknet. Die trockene Substanz (1,9 mmol) wurde in 300 ml Methyl-Cellusolve gelöst, mit NH_2OH (20,9 g NH_2OH in 200 ml Methyl-Cellusolve + 12 g NaOH in 200 ml Methyl-Cellusolve) versetzt und 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde in 150 ml Pyridin/0,2 N NaOH (1/1 v/v) aufgenommen. Nach 1,5 Stdn. Rühren bei Raumtemperatur wurde von unlöslichem Material abfiltriert, mit 12 N H_2SO_4 auf pH 1,0 eingestellt und 2 x mit je 500 ml Essigester extrahiert. Die H_2O -Phase wurde im Vakuum einrotiert. Der weiße, nicht ganz trockene Rückstand wurde in 150 ml TFA + 30 ml Anisol aufgenommen, 10 min bei Raumtemperatur gehalten und filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum einrotiert; das resultierende Öl wurde mit Essigester/ H_2O (120 ml/120 ml) ausgeschüttelt. Die H_2O -Phase wurde lyophilisiert; sie enthielt 1,4 mmol Hydroxamat. Das Lyophilisat wurde in 10 ml H_2O aufgenommen und auf eine Dowex 50 W X 4 Säule (2,5 x 20 cm, äquilibriert mit 20 mM $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) aufgesetzt. Das Produkt wurde mit einem Gradienten von 20 mM $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ bis 200 mM Pyridin eluiert. Die Hydroxamat enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Das so erhaltene Produkt (1,2 mmol, Ausbeute 7 %, Fp. = 149-153°C) war einheitlich auf der Hochspannungs-Papierelektrophorese bei pH 4,5; nach Besprühen mit Ninhydrin bzw. mit Fe-III-Reagenz wurde nur ein Fleck sichtbar (4,5 cm vom Auftragspunkt entfernt

in Richtung Kathode). Bei der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie zeigte das Produkt ebenfalls nur einen bei 215 nm absorbierenden und Fe-III-positiven Gipfel (Elutionszeit: 6,4 min, Laufmittel: 5 % v/v Methanol/H₂O, 0,37 mM an HCl, 5 ml/min).

7.6.5.2. Enzymatische Synthese von U-¹⁴C-DL-2-Aminoadipyl-6-Hydroxamat

Die Inkubation enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 ml:

MgCl₂ (36 µMol), ATP (20 µMol), DTT (2 µMol), SA (2mg), KH₂PO₄/K₂HPO₄ (80 µMol, pH 7,0), NH₂OH (2 mMol, bidestilliert und neutralisiert), U-¹⁴C-DL-AAA (94 nMol, 5 µCi, über HPLC gereinigt), anorganische Pyrophosphatase (50 U), Enzym (2-6 mg).

Kontrollinkubationen enthielten entweder kein ATP oder kein Enzym. Die Mischung wurde 30 min bei 25°C inkubiert, dann mit 100 µl (1,3 µMol) AAA-6-NHOH als Träger versetzt und mit 200 µl TCA in der Kälte abgestoppt. Gefälltes Protein wurde abzentrifugiert, der Überstand wurde lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde 3 x mit je 1 ml Äthanol (70 % v/v) extrahiert; die vereinigten Extrakte wurden mit 5 ml H₂O verdünnt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 100 µl H₂O gelöst und durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt. Laufmittel: 5 % v/v Methanol/H₂O, 0,37 mM an HCl, 5 ml/min, 1200 psi. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen; Aliquote der einzelnen Fraktionen wurden auf Radioaktivität und auf Fe-III-Hydroxamat-Bildung untersucht. Hydroxamsäure enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 200 µl H₂O aufgenommen, auf Whatman 3 MM-Papier aufgetragen und wie unter 7.6.5.1. beschrieben der Elektrophorese unterworfen.

Nach Beendigung des Laufes wurde das Papier für 45 min bei 50°C getrocknet und längs der Laufrichtung in Streifen geschnitten. Die Lage der radioaktiven Flecken wurde im Papierstreifen-Zähler ermittelt. Besprühen des Chromatogramms mit Fe-III-Reagenz bzw. Ninhydrin machte die Hydroxamsäure bzw. die freie AAA sichtbar. Zur quantitativen Auswertung des Versuchs wurde der Hydroxamsäure-Fleck ausgeschnitten und in Scintillator gezählt.

Reinigung von ^{14}C -AAA: 100 μl (30 μCi) U- ^{14}C -DL-2-AAA wurden im oben beschriebenen System durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie gereinigt. ^{14}C -AAA enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Das Produkt wurde der Hochspannungspapierelektrophorese bei pH 4,5 unterworfen, vom Papier eluiert und lyophilisiert.

7.6.6. ATP/ADP-Austausch (43)

Die Reaktionsmischung enthielt in einem Gesamtvolumen von 300 μl : ^{14}C -ADP (0,1 μMol , 0,5 μCi), ATP (0,1 μMol), DL-AAA (1,8 μMol), SA (0,3 mg), DTT (0,3 μMol), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (15 μMol , pH 7,0), MgCl_2 (4 μMol), Enzym (5-10 mg). Inkubationen des Modellsystems enthielten Acetat (1,8 μMol) statt AAA und Acetatkinase (0,5-5 mU) statt Enzym. Kontrollinkubationen enthielten keine AAA bzw. kein Acetat.

Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von Protein. Nach 15 min bei 25°C wurde mit 100 μl HClO_4 (15 %, v/v) in der Kälte abgestoppt. Denaturiertes Protein wurde abzentrifugiert;

Der Überstand wurde mit 2 N KOH neutralisiert, 10 min im Eis stehengelassen und zentrifugiert. Aliquote des Überstandes wurden auf Schleicher + Schüll-Papier 2040 b aufgetragen. ATP und ADP wurden durch Hochspannungs-Papierelektrophorese (50 V/cm, 60 min, Citrat-Puffer 100 mM, pH 3,1) voneinander getrennt. Die Nucleotide wurden im UV-Licht sichtbar. Die markierten Flecken wurden ausgeschnitten, ihre Radioaktivität wurde in Scintillator bestimmt.

7.7. Zu Kapitel 5

7.7.1. Synthese von 6-(DL-2-Aminoadipinsäure)-L-Cysteinyl-D-Valin (ACV)

Die Synthese von ACV erfolgte im Wesentlichen nach einer Vorschrift von Fawcett et al. (30).

N-Hydroxymethyl-Acetamid (44)

590 g (10 Mol) Acetamid wurde mit 60 g K_2CO_3 in 940 g (11 Mol) Formaldehyd (37 %) 5 min auf 70°C erhitzt. Die Lösung wurde zwei Tage stehengelassen, mit konz. HCl auf pH 7,2 gebracht und im Vakuum eingedampft. Nach Zugabe von wasserfreiem Na_2SO_4 wurde 2 x mit je 500 ml Aceton extrahiert. Die Vereinigten Extrakte wurden im Vakuum eingedampft. Das zurückbleibende farblose Öl erstarrte innerhalb 24 Stdn. bei -20°C zu einer weißen kristallinen Masse, die in 500 ml Essigester bei 40°C aufgenommen, 2 Stdn. gerührt und filtriert wurde. Die über Nacht bei 4°C gebildeten weißen Kristalle wurden abgesaugt, mit kaltem Essigester gewaschen und an der Ölpumpe getrocknet. Ausbeute: 116 g (13 % der Theorie) weiße, sehr hygroskopische Kristalle mit Fp. = 47-50°C.

S-Acetamidomethyl-L-Cystein(SACM-Cys) (45)

116 g N-Hydroxymethyl-acetamid (1,3 Mol) und 228 g L-Cystein-Hydrochlorid (1,3 Mol) wurden in 350 ml H_2O unter Kühlen auf $0^{\circ}C$ gelöst. Nach Zugabe von 50 ml konz. HCl wurde die Mischung zwei Tage bei Raumtemperatur unter N_2 stehengelassen. Das Fortschreiten der Reaktion wurde durch DC in LM A überprüft (R_F SACM-Cys: 0,19, R_F Cys: 0,25). Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung im Vakuum bei ca. $40^{\circ}C$ einrotiert. Das resultierende farblose Öl wurde 4 x in 200 ml absolutem Äthanol aufgenommen und einrotiert, um Wasserspuren zu entfernen. Der feste weiße Rückstand wurde in wenig Methanol bei Raumtemperatur gelöst; Diäthyläther wurde bis zum Auftreten einer leichten Trübung zugegeben. Die nach drei Tagen bei $4^{\circ}C$ gebildeten weißen Kristalle wurden abgesaugt, mit Diäthyläther gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 189 g (66 % der Theorie, Lit.: 52 %); Fp. $153-155^{\circ}C$ (Lit.: $159-163^{\circ}C$). DC in LM A zeigte nur einen Ninhydrin-positiven Fleck mit $R_F = 0,19$.

N-Benzoyloxycarbonyl-S-Acetamidomethyl-L-Cystein-Hydrochlorid(NZ-SACM-Cys) (46).

Zu einer Suspension von 44,5 g (530 mMol) $NaHCO_3$ in 220 ml Aceton/ H_2O (1/1 v/v) wurden 48,4 g (210 mMol) S-ACM-Cys zugegeben. Unter starkem Rühren wurden 120 g (345 mMol) Carbo-benzoylchlorid innerhalb 30 min zugetropft. Nach einer Stunde Rühren wurde die Lösung 1 x mit 50 ml Diäthyläther extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 5 N HCl unter Kühlen auf pH 3 eingestellt. Das abgeschiedene Öl wurde in Essigester extrahiert. Die Essigesterphase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum

bei etwa 40°C einrotiert. Das zurückbleibende leicht gelbliche Öl zeigte in der DC mit LM A nach Besprühen mit TFA (70 % v/v) und Ninhydrin nur einen Fleck mit $R_F = 0,53$. Ausbeute: 48 g (70 % der Theorie; Lit. 62 %).

D-Valin-Äthylester (47)

210 g (1,8 Mol) D-Valin wurden in 920 g (20 Mol) Äthanol suspendiert und am Rückfluß erhitzt. Während einer Stunde wurde HCl-Gas unter starkem Rühren eingeleitet. Nach einer weiteren Stunde wurde überschüssiges Äthanol abdestilliert. Der Rückstand wurde in 1 ltr. eiskaltes H_2O dest. gegossen, mit festem Na_2CO_3 auf pH 10 gebracht und 3 x mit je 600 ml Diäthyläther extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bei Raumtemperatur eingedampft. Die zurückgebliebene Flüssigkeit wurde im Vakuum destilliert. K_p 9 Torr = 62-65°C (Lit. 63,5°C). Ausbeute: 165 g (64 % der Theorie) einer farblosen, klaren Flüssigkeit. Im NMR-Spektrum* sind keine Verunreinigungen zu erkennen (s. Abb. 44).

N-Benzoyloxycarbonyl-S-Acetamidomethyl-L-Cysteinyld-Valin-Äthylester (NZ-SACM-Cys-ValOEt) (30)

12,2 g (37 mMol) NZ-SACM-Cys, 5 g Hydroxybenztriazol (37 mMol) und 8,4 g (41 mMol) DCC wurden in 200 ml Chloroform bei 0°C gelöst. Die Mischung wurde bei 0°C für 60 min und weitere 60 min bei 20°C gerührt. 5,3 g (37 mMol) ValOEt in 100 ml Chloroform wurden zugegeben; die Lösung wurde 10 min bei 20°C gehalten.

* Für die Durchführung des NMR-Spektrums danken wir Frau Schild (MPI für Biochemie).

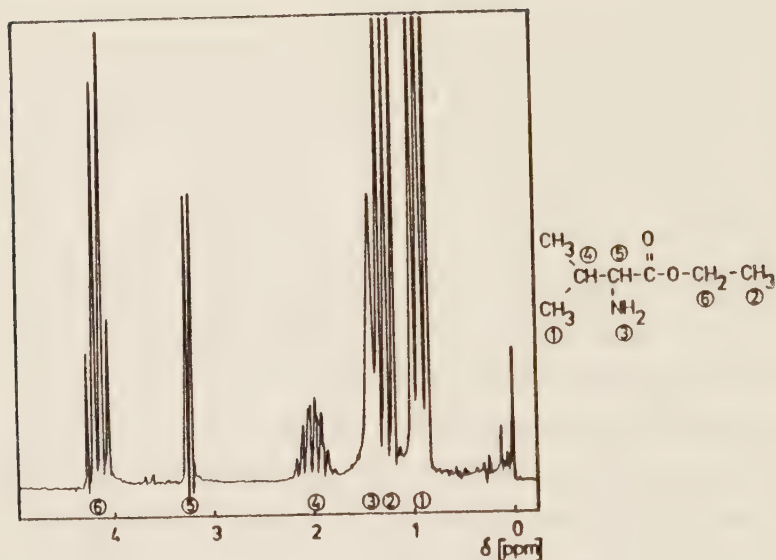


Abb. 44: NMR-Spektrum von D-Valinäthylester

Ausgefallener Dicyclohexyl-Harnstoff wurde abfiltriert, das klare Filtrat wurde im Vakuum eingedampft. Die zurückgebliebene dunkelgelbe Flüssigkeit wurde mit 500 ml Essigester/H₂O (1/1 v/v) geschüttelt, die organische Phase wurde 2 x mit je 300 ml 3 % v/v CH₃COOH, 2 x mit je 300 ml 5 % w/v NaHCO₃ und 2 x mit je 300 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum einrotiert. Der so erhaltene feste gelbe Rückstand wurde in 30 ml Essigester aufgenommen und über eine Kieselgelsäule (Kieselgel G, Typ 60, Größe C, Fa. Merck) filtriert. Die Elution erfolgte mit Essigester. 5 ml Fraktionen wurden auffangen. 2 µl Aliquote der einzelnen Fraktionen wurden in Essigester als Laufmittel auf Kieselgelplatten chromatographiert. Die das Produkt (R_F = 0,28) enthaltenden Fraktionen

wurden vereinigt und im Vakuum einrotiert. Der leicht gelbe Rückstand wurde in 30 ml Butan-2-ol gelöst und bei -20°C mehrere Tage aufgehoben. Die weißen Kristalle wurden abgesaugt, mit wenig Isopropanol und Diäthyläther gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 4,9 g (29 % der Theorie); Fp. = $126-129^{\circ}\text{C}$ (Lit. $132-133^{\circ}\text{C}$). Nach DC in Essigester als LM war nur ein Ninhydrin-positiver Fleck zu erkennen.

N-4-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-DL-2-Aminoadipinsäure (MOZ-AAA)
(48)

30 g (186 mMol) DL-2-AAA wurden in einer Mischung aus 280 ml Na_2CO_3 (0,5 M in H_2O) und 650 ml NaHCO_3 (0,5 M in H_2O) gelöst; der pH-Wert der Lösung wurde mit 2 N NaOH auf 9,5 eingestellt. 57,5 g (250 nMol) 4-Methoxybenzyl-oxycarbonylazid in einem Liter Dioxan wurden zugegeben. Die klare, leicht gelbliche Lösung wurde 4 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH-Wert durch Zugabe von 2 N NaOH auf 9,5 gehalten wurde. Der gebildete weiße Niederschlag wurde abfiltriert, das klare Filtrat wurde mit einem Liter Diäthyläther extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 M H_2SO_4 auf pH 2 eingestellt und 2 x mit je 1 ltr. Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigester-Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum einrotiert. Das zurückgebliebene Öl wurde 5 x mit je 300 ml Petroläther digeriert. Der so erhaltene weiße Feststoff (40 g, 67 % der Theorie, Fp. = $109-112^{\circ}\text{C}$) wurde in 400 ml Essigester unter Erwärmen gelöst; 300 ml Petroläther wurden zugesetzt. Die über Nacht bei 4°C gebildeten weißen Kristalle wurden abgesaugt, mit Petroläther gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 29 g

(49 % der Theorie, Lit.: 85 %), Fp. = 115-117°C (Lit.: 111-112,5°C). Nach DC in LM B und LM C war nur ein Ninhydrin-positiver Fleck mit $R_F = 0,29$ bzw. $R_F = 0,59$ zu erkennen.

1-(N-4-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-DL-2-Aminoadipinsäure)-4-Methoxybenzylester (DCHA - Salz) (MOZ-AAA-MB-Ester) (48)

29 g (90 mmol) MOZ-AAA wurden in 45 ml Dimethylformamid, enthaltend 12,6 ml (90 mmol) Triäthylmain gelöst. Zur klaren Lösung wurden 15,3 g (99 mmol) 4-Methoxybenzylchlorid in 45 ml Dimethylformamid zugegeben. Die Mischung wurde für 24 Stdn. bei 37°C gehalten. Nach Zugabe von 450 ml H₂O wurde das sich abscheidende weiße Öl 3 x in je 500 ml Diäthyläther extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden 4 x mit je 500 ml Mc Ilvaine's Puffer* und 1 x mit 500 ml H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der bräunliche Rückstand wurde 2 x mit je 600 ml Diäthyläther gewaschen und in 200 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wurde 3 x mit je 300 ml McIlvain's Puffer gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der weiße kristalline Rückstand wurde in 100 ml Chloroform gelöst, mit 100 ml Dicyclohexylamin in 100 ml Chloroform versetzt und über Nacht bei 4°C gehalten. Die klare Lösung wurde im Vakuum eingedampft, der weiße Rückstand wurde in 50 ml Diäthyläther gelöst. Nach 24 Stdn. bei 0°C hatten sich weiße Kristalle abgeschieden, die mit kaltem Diäthyläther gewaschen und getrocknet wurden. Ausbeute:

* McIlvaine's Puffer: 0,2 M Na₂HPO₄ wird mit 0,1 M Citronensäure auf pH 5,0 eingestellt (49).

15 g (27 % der Theorie) Fp. = 105-107°C (Lit.: 101-107°C);
nach DC in LM B war nur ein Ninhydrin-positiver Fleck zu erkennen ($R_F = 0,60$).

Die freie Säure wurde erhalten durch Schütteln des DCHA-Salzes mit Diäthyläther und McIlvaine's Puffer pH 3,0. Die Ätherphase wurde 1 x mit Puffer und 1 x mit H₂O gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die freie Säure blieb als farbloser Gummi zurück; Ausbeute: 93-98 %.

S-Acetamidomethyl-L-Cysteinyl-D-Valinäthylester (SACM-Cys-ValOEt) (30).

1,37 g (3mMol) NZ-SACM-Cys-ValOEt wurden in 30 ml HBr (45 % w/v in CH₃COOH) für 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Produkt wurde durch Zugabe von 100 ml Diäthyläther ausgefällt, mit Äther gewaschen, in 50 ml CHCl₃ (enthaltend 6 ml Triäthylamin) aufgenommen und im Vakuum bei 35°C einrotiert. Der feste weiße Rückstand wurde in 30 ml CHCl₃ aufgenommen und sofort zur Tripeptid-Synthese verwendet (s. nächster Schritt).

6-(N-4-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-DL-2-Aminoadipinsäure-1-(4-Methoxybenzylester)-S-Acetamidomethyl-L-Cysteinyl-D-Valin-Äthylester (MOZ-AAA-MB-SACM-Cys-ValOEt) (30)

1,35 g (3 mMol) MOZ-AAA-MB-Ester (freie Säure), 687 mg (3,3 mMol) DCC und 455 mg (3 mMol) Hydroxybenztriazol wurden in 50 ml CHCl₃ gelöst. Die zunächst klare Lösung wurde eine Stunde bei 0°C und eine weitere Stunde bei 20°C gerührt. Nach Zugabe von 3 mMol SACM-Cys-ValOEt in 30 ml CHCl₃ wurde 3 Stdn. bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Ausgefallenes Material wurde abfiltriert, das klare Filtrat wurde im Vakuum eingedampft. Der

trockene Rückstand wurde in 20 ml CHCl_3 /Essigester (1/1, v/v) gelöst und gereinigt durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule (Kieselgel G, Typ 60, Größe C, Fa. Merck) in Essigester als Fließmittel. 5 ml Fraktionen wurden aufgefangen. 2 μl Aliquote der einzelnen Fraktionen wurden in LM C auf Kieselgelplatten chromatographiert. Die das Produkt ($R_F = 0,78$) enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingedampft. Der weiße Rückstand wurde aus Essigester umkristallisiert. Ausbeute: 1,0 g (45 % der Theorie; Lit.: 55 %); Fp. = 159-164°C (Lit.: 155-156°C). Nach DC in LM C war nur ein Ninhydrin-positiver Fleck zu erkennen.

6-(N-4-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-DL-2-Aminoadipinsäure)-S-Acetamidomethyl-L-Cysteinyl-D-Valin (MOZ-AAA-SACM-Cys-Val) (30)

1,0 g voll geschütztes Tripeptid (1,35 mMol) wurden in einer Mischung aus 20 ml Pyridin und 20 ml 0,2 N NaOH gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 200 ml H_2O verdünnt, mit 2 N H_2SO_4 auf pH 2,0 eingestellt und 3 x mit je 200 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum einrotiert. Zurückblieben 0,61 g (Ausbeute 75 %) eines farblosen Gummis.

6-(DL-2-Aminoadipyl)-S-Acetamidomethyl-L-Cysteinyl-D-Valin (AAA-SACM-Cys-Val) (30).

0,61 g (1 mMol) MOZ-AAA-SACM-Cys-Val wurden in einer Mischung aus 50 ml TFA und 6 ml Anisol gelöst. Die Lösung wurde im Vakuum bei 30°C eingedampft. Der Rückstand wurde mit 100 ml Essigester und 100 ml H_2O geschüttelt, wobei das Produkt in

Lösung ging. Die wässrige Phase wurde 1 x mit 100 ml Essig-
ester gewaschen und lyophilisiert. Das weiße Produkt wurde aus
Aceton/H₂O (1/1, v/v) umkristallisiert. Ausbeute: 371 mg
(85 % der Theorie) weiße Kristalle mit Fp. = 133-136°C
(Lit.: 135-136°C), die nach Papierchromatographie (absteigend,
Whatman 1 MM) in LM C nur einen Ninhydrin-positiven Fleck mit
 $R_F = 0,5$ zeigten.

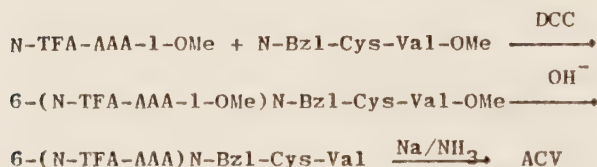
6-(DL-2-Aminoadipyl)-L-Cysteiny-D-Valin (ACV) (30)

371 mg (0,85 mMol) AAA-SACM-Cys-Val wurden in 50 ml H₂O gelöst.
Nach Zugabe von 3 mMol Hg-Acetat wurde 2 Stdn. bei Raumtempe-
ratur gerührt. Der weiße Niederschlag wurde abzentrifugiert,
3 x mit je 100 ml H₂O gewaschen, in 100 ml H₂O auspendiert und
mit H₂S zersetzt. Ausgefallenes HgS wurde abfiltriert; das
klare Filtrat wurde im Vakuum von überschüssigem H₂S befreit
und lyophilisiert. Ausbeute: 254 mg (82 % der Theorie) weißes
Pulver.

Nach Perameisensäure-Oxydation zeigte die Substanz bei der Hoch-
spannungs-Papierelektrophorese (2 h, pH 1,8) nur einen Ninhy-
drin-positiven Fleck (5 cm vom Auftragspunkt in Richtung Anode).
Elektrophorese des nicht oxydierten Produktes bei pH 4,5 zeig-
te zwei Ninhydrin-positive Flecken. Der schneller wandernde
Fleck verschwand jedoch, wenn das Tripeptid vor der Elektro-
phorese mit einem 100-fachen molaren Überschuß an DTT für
3 Stdn. inkubiert worden war. Dieser Fleck war also offensicht-
lich das korrespondierende Disulfid von ACV. Die Aminosäure-

analyse* des mit PAS oxydierten und mit 6 N HCl hydrolysier-
ten Tripeptids ergab die drei Aminosäuren in äquimolaren Mengen.

Das für die Vorversuche (s.S. 56) verwendete ACV wurde freund-
licherweise von Fräulein Bettina Baier (Universität Tübingen)
synthetisiert. Die Synthese verlief nach folgendem Schema:



So gewonnenes ACV hatte bei der Hochspannungs-Papierelektro-
phorese die gleichen Eigenschaften wie das nach 7.7.1. syntheti-
sierte Produkt.

7.7.2. Inkubationen zur enzymatischen Synthese von ACV

Die Prozedur entspricht im Wesentlichen der von Fawcett et al.
(50) vorgeschlagenen. Zur Zusammensetzung der Inkubationen siehe
Tab. 2 .

Kontrollinkubationen enthielten kein ATP bzw. kein Enzym. Der
Ansatz wurde bei 25°C für 5 min bis 3 Std. inkubiert, mit 1 µMol
synthetischem ACV versetzt, mit 500 µl kalter HClO₄ 15 % v/v
- ersatzweise durch 5 min Erhitzen auf 100°C - abgestoppt und
durch Zentrifugation von denaturiertem Protein befreit. Der
Überstand wurde mit 2 N KOH neutralisiert, 10 min bei 0°C
gehalten und zentrifugiert. Der Überstand wurde lyophilisiert;

* Für die Durchführung der Aminosäureanalyse danken wir
Fräulein Karin Hübner (MPI für Biochemie, Martinsried).

das Lyophilisat wurde 2 x mit je 400 μ l Äthanol 70 % v/v extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 2 ml H_2O verdünnt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit 1 ml PAS bei $0^\circ C$ für 6 Stdn. oxydiert, die Lösung mit 2 ml H_2O verdünnt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 100 μ l H_2O aufgenommen und auf Whatman 3 MM-Papier bei pH 1,8 der Elektrophorese unterworfen. Unter diesen Bedingungen wanderten AAA und Valin in Richtung Kathode, ACV-SO₃H und Cys-SO₃H in Richtung Anode. Die Lage radioaktiver Flecken wurde durch Autoradiographie bzw. durch Aufnahme eines Radioaktivitätsdiagramms im Streifen-zähler ermittelt. Aminosäuren und Peptide wurden durch Besprühen des Chromatogramms mit Ninhydrin sichtbar gemacht.

Einige Inkubationsansätze wurden nach einer Methode von Chan et al. aufgearbeitet (14):

Das Verfahren ist bis einschließlich der ersten Lyophilisation identisch mit dem vorher beschriebenen. Die vereinigten Äthanol-Extrakte wurden mit H_2O verdünnt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 1 ml H_2O aufgenommen, der pH-Wert wurde mit 10 % HCl auf 3,0 eingestellt. Die klare Lösung wurde auf eine Säule (1 x 10 cm) von Dowex 50 W X 4, H^+ -Form, 100-200 mesh, aufgesetzt. Die Säule war mit H_2O äquilibriert. Nach Spülen mit 50 ml H_2O wurden Aminosäuren und Peptide mit 1 M wässrigem Pyridin eluiert. Die Radioaktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit 1 ml PAS oxydiert, mit 2 ml H_2O verdünnt und lyophilisiert.

Der Rückstand wurde in 1 ml H_2O gelöst und wie oben beschrieben auf eine Dowex 50-Säule aufgesetzt. Die Säule wurde mit H_2O gespült; ACV- SO_3H und Cys- SO_3H wurden in den ersten 20 ml des Durchlaufs eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert und wie vorher beschrieben der Hochspannungspapierelektrophorese bei pH 1,8 unterworfen. Unter diesen Bedingungen waren außer ACV- SO_3H und Cys- SO_3H keine anderen Aminosäuren oder Peptide auf dem Chromatogramm nachzuweisen.

7.7.3. Synthese von 6-(DL-2-Aminoadipyl)L-Cystein (AC)

2,22 g (5 mMol) MOZ-AAA-MB-Ester (s.S. 96) wurden mit 1,3 g (6 mMol) DCC und 675 mg (5mMol) Hydroxybenztriazol in 50 ml CHCl_3 1 h bei 0°C und eine weitere Stunde bei 20°C gerührt. Nach Zugabe von 1,14 g (5 mMol) Z-CysOME in 20 ml CHCl_3 wurde 3 h bei 20°C reagieren gelassen. Ausgefallenes Material wurde durch Filtration entfernt; das klare Filtrat wurde im Vakuum eingedampft. Das resultierende gelbliche Öl wurde in Essigester aufgenommen und über eine Kieselgelsäure (Fa. Merck, Größe C, LM B) gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen ($R_F = 0,65$ auf HPTLC-Platten in LM B) wurden vereinigt und im Vakuum eingedampft. Das zurückgebliebene gelbliche Öl (2,1 g = 66 % Ausbeute) wurde in 25 ml Pyridin/25 ml 0,2 N NaOH aufgenommen und 1 h bei 20°C gerührt. Nach Zugabe von 200 ml H_2O wurde mit 200 ml Et_2O extrahiert und die wässrige Phase mit 2 N H_2SO_4 auf pH 2,0 eingestellt. Das Produkt wurde mit Essigester extrahiert (3 x 250 ml); die vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Zur Entfernung der N-Substituenten wurde das entstandene Öl in ca. 50 ml

flüssigem NH_3 unter Kühlen mit MeOH /Trockeneis gelöst. Kleine Stücke Na wurden unter Rühren zugegeben, bis die Blaufärbung mindestens 5 min bestehen blieb. Überschüssiges Na wurde durch Zugabe von AS abgefangen. Der Ammoniak wurde abgedampft, das Produkt 2 h im Vakuum über konz. H_2SO_4 getrocknet. Der Rückstand wurde in 25 ml 0,5 N H_2SO_4 aufgenommen und mit Hopkins Reagenz* versetzt, bis keine weitere Fällung mehr auftrat. Der gebildete Niederschlag wurde am nächsten Tag abzentrifugiert, 5 x mit H_2O gewaschen und in 20 ml H_2O suspendiert. Die Suspension wurde mit H_2S gesättigt und filtriert. Das klare Filtrat wurde lyophilisiert. Wir erhielten 0,39 g (1,5 mMol - 30 % Ausbeute) weiße Substanz. Nach Perameisensäure-Oxydation war bei der Hochspannungs-Papierelektrophorese (2 h, pH 1,8) nur ein Ninhydrin-positiver Fleck (5,5 cm vom Auftragspunkt in Richtung Anode) nachzuweisen. Elektrophorese des nicht oxydierten Produktes bei pH 4,5 zeigte zwei Ninhydrin-positive Flecken. Der schneller wandernde Fleck verschwand jedoch, wenn die Substanz vor der Elektrophorese mit einem 100-fachen molaren Überschuß an DTT für 3 h inkubiert worden war. Es handelte sich also offensichtlich um das korrespondierende Disulfid von AC.

7.7.4. Inkubationen zur enzymatischen Synthese von Amino adipylcystein

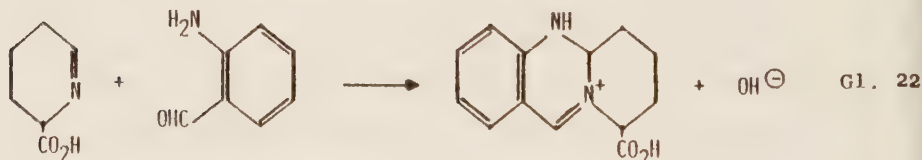
Die Zusammensetzung der Inkubationen und ihre Aufarbeitung entsprechen denen für den Nachweis von ACV (s. Tab. 3 und S. 100).

* 200 g HgSO_4 + 50 ml 10 N H_2SO_4 + 40 ml. konz. H_2SO_4 + 600 ml H_2O

Es wurde jedoch kein Valin zugesetzt; außerdem wurde als Träger bei der Isolierung des Reaktionsproduktes Amino adipylcystein statt Amino adipylcysteinylvalin eingesetzt.

7.7.5. DL-2-Amino adipinsäure-6-semialdehyd-Bildung

Die Bestimmung von AAA-CHO erfolgte nach der Vorschrift von Larson et al. (51). Der Aldehyd, der im Gleichgewicht vorliegt mit seiner cyclisierten Form (Δ -1-Piperidin-6-Carboxylsäure) reagiert nach Gl. 22



mit o-Aminobenzaldehyd zu einem orangefarbenen Addukt, dessen Konzentration durch Messung der Adsorption bei 450 nm bestimmt werden kann.

Die Inkubation enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml:

MgCl_2 (16 μMol), ATP (3 μMol), DL-2-AAA (10 μMol), DTT (1 μMol), NADPH (3 μMol), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (40 μMol , pH 7,0), o-Aminobenzaldehyd (4 μMol), Enzym (1-8 mg).

Kontrollinkubationen enthielten entweder keine AAA oder kein Enzym. Nach 10 bis 180 min bei 25⁰ C wurde der Ansatz für 5 min auf 100⁰C erhitzt; denaturiertes Protein wurde abzentrifugiert, die optische Dichte des Überstandes bei 450 nm im Photometer bestimmt.

7.7.6. Enzym-AMP-AAA-Komplex

Die Inkubation enthielt in einem Gesamtvolumen von 800 µl:

4,5 mg Enzym, U-¹⁴C-DL-AAA (5 µCi, 53 µCi/µMol), ATP (1,6 nMol-2,4 µMol), MgCl₂ (4 µMol), KH₂PO₄/K₂HPO₄ (10-50 µMol, pH 7,0), DTT (0,8 µMol), anorg. Pyrophosphatase (5 U).

Nach 1 min - 30 min bei 25⁰C wurde die Mischung auf 0⁰C abgekühlt und über eine Sephadex G-50 Säule filtriert (1,5 x 60 cm). 1 ml Fraktionen wurden aufgefangen. Das Eluat wurde bei 280 nm vermessen, 500 µl Aliquote der einzelnen Fraktionen wurden mit 10 ml Unisolve versetzt und auf Radioaktivität getestet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Fleming, A. (1929): Brit. J. Exp. Pathol. 10, 226
2. Demain, A.L. (1959): Adv. Appl. Microbiol. 1, 23
3. Öppinger, H., Hoffmann, H. (1971): Antibiotika 7, 647
4. Bhattacharjee, J.K. (1970): Can. J. Genet. Cytol. 12, 785
5. Glass, J., Bhattacharjee, J.K. (1971): Genetics 67, 365
6. Trupin, J.S., Broquist, H.P. (1965): J. Biol. Chem. 240,
2524
7. Hogg, R.W., Broquist, H.P. (1968): J. Biol. Chem. 243,
1839
8. Sinha, A.K., Kurtz, M., Bhattacharjee, J.K. (1971): J.
Bacteriol. 108, 715
9. Demain, A.L. (1957): Arch. Biochem. Biophys. 67, 244
10. Somerson, N.L., Demain, A.L., Nunheimer, T.D. (1961):
Arch. Biochem. Biophys. 93, 238
11. Warren, S.C., Newton, G.G.F., Abraham, E.P. (1967):
Biochem. J. 103, 891 und Biochem. J. 103, 902
12. Bauer, K. (1970): Z. Naturforsch. 25b, 1125
13. Loder, P.B., Abraham, E.P. (1971): Biochem. J. 123, 477
14. Chan, J.A., Fu-Chih Huang, Sih, C.J. (1976): Biochemistry
15, 177
15. Sagisaka, S., Shimura, K. (1962): J. Biochem. 51, 398 und
J. Biochem. 52, 155
16. Sinha, A.K., Bhattacharjee, J.K. (1971): Biochem. J. 125,
743
17. Übersicht: Kurakaski, K. in: Ann. Rev. Biochem. 43 (1974),
445

18. Gevers, W., Kleinkauf, H., Lipmann, F. (1969): Proc. Natl. Ac. Sc. 63, 1335
19. Mooz, E.D., Meister, A. (1967): Biochemistry 6, 1722
20. Whitaker, J.R. (1963): Anal. Chem. 35, 1950
21. Handbook of Biochemistry, Ed.: Sorber, H.A., Harte, R.A.,
2nd ed. (1971): Chemical Rubber, Cleveland, Ohio
22. Martin, R.G., Ames, B.N. (1961): J. Biol. Chem. 236, 1372
23. Frøyschow, Ø. (1974): FEBS Lett. 44, 75
24. Roskoski, R., Gevers, W., Kleinkauf, H., Lipmann, F. (1970):
Biochemistry 9, 4839
25. Kurylo-Borowska, Z., Tatum, E.L. (1966): BBA 114, 206
26. Vater, J., Kleinkauf, H. (1976): BBA 429, 1062
27. Gawehn, K. in: Methoden der enzymatischen Analyse, Hrsg.
Bergmeyer, H.U., 3. Auflage 1975, S. 2293.
Verlag Chemie, Weinheim und
Jaworek, D., Gruber, W., Bergmeyer, H.U. *ibid*, S. 2178
28. Lipmann, F., Tuttle, L.C. (1945): J. Biol. Chem. 161, 415
29. Arnstein, H.R.V., Morris, D. (1960): Biochem. J. 76, 357
30. Fawcett, P.A., Usher, J.J., Huddleston, J.A., Bleaney,
R.C., Nisbet, J.J., Abraham, E.P. (1976): Biochem.
J. 157, 651
31. Muench, K.H., Berg, P. in: Procedures in Nucleic Acid
Research, ed. Cantoin, G.L. and Dowies, D.R. (New
York, Harper and Row, 1966), S. 376
32. Kleinkauf, H., Gevers, W., Lipmann, F. (1969): Proc. Natl.
Ac. Sc. 62, 226
33. Bartmann, P., Hanke, T., Holler, E. (1976). Anal. Biochem.
70, 174

34. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czod, R.,
Barbade, K.H., Meyer-Ahrendt, E., Pfeleiderer, G.
(1953): Z. Naturf. 8b, 555
35. Warburg, O., Christian, W. (1942): Biochem. Z. 310, 384
36. Schreckenbach, Th (1975). Dissertation, Universität München
37. Behrend, O.K., Corse, J., Jones, R.G., Mann, M.J.,
Soper, Q.F., Abeelee, F.R., Ming-Chien Chiang (1948):
J. Biol. Chem. 175, 751
38. Boxer, G.E., Everett, P.M. (1949): Anal. Chem. 21, 670
39. Merckenschlager, M., Schlossmann, K., Kurz, W. (1957):
Biochem. Z. 329, 332
40. Lämmli, U.K. (1970): Nature 227, 680
41. Calendar, R., Berg, P. (1966): Biochem. 5, 1681
42. Wood, T. (1968): J. Chromat. 35, 352
43. Lynen, F., Knappe, J., Lorch, E., Jütting, G., Ringelmann,
E., Lachance, J.P. (1961): Biochem. Z. 335, 123
44. Einhorn, A. (1905): Ann. 343, 207
45. Veber, D.F., Milkowski, J.D., Vargo, S.L., Denkelwater,
R.G., Hirschmann, R. (1972): J. Am. Chem. Soc. 94,
5456
46. Greenstein, J.P., Winitz, M. (1961): in: Chemistry of the
Aminoacids, Vol. 2, S. 895. Wiley and Sons, New
York, San Francisco, London
47. Slimmer (1921): Ber. Chem. Ges. 35, 401
48. Usher, J.J., Loder, B., Abraham, E.P. (1975): Biochem. J.
151, 729
49. McIlvaine, T.C. (1921): J. Biol. Chem. 49, 183

50. Fawcett, P.A., Abraham, E.P. (1975) in: Methods in Enzymology, Vol. XLIII, S. 471; Nash, H.J., ed., Academic Press, New York, London
51. Larson, R.L., Sandine, W.D., Broquist, H.P. (1963): J. Biol. Chem. 238, 275

LEBENS LAUF

Name: Heinz Jürgen Bergmeyer

Geburtsdatum: 10. 3. 1949

Geburtsort: Bonn

Eltern: Prof. Dr. rer.nat. Hans-Ulrich Bergmeyer und
Ingrid Hermine Bergmeyer, geb. Schauerte

Schulbildung:

1955 - 1959 Volksschule Tutzing

1959 - 1968 Gymnasium Tutzing (neusprachlich), Abitur

Akademische Bildung:

1968 - 1970 Studium der Chemie an der Universität München,
Diplomvorprüfung

1970 - 1971 Studium der Chemie an der Universität Freiburg

1971 - 1974 Studium der Chemie an der Universität München,
Diplomhauptprüfung

Nov. 1974 - Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter An-
Dez. 1978 leitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

